

**Der Einfluss einer chronischen Koffeinapplikation auf das
adenosinerge System im Hinblick auf schlafregulierende und
neuroprotektive Effekte im ZNS der Ratte**

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)
der
Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich–Wilhelms–Universität Bonn

vorgelegt von

Danje Nabbi

aus Jülich

Bonn, Dezember 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich–Wilhelms–Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bauer

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 12.05.2016

Erscheinungsjahr: 2016

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DER SCHLAF	2
1.1.1	Schlafeinleitung	3
1.1.2	Schlafstadien	5
1.1.3	Schlaf–Wach–Regulation	7
1.2	DAS ADENOSINERGE SYSTEM	8
1.2.1	Adenosin	8
1.2.2	Synthese und Metabolismus	9
1.2.3	Adenosinrezeptoren	11
1.2.4	Das adenosinerge System und seine Rolle in der Schlaf–Wach–Regulation	13
1.3	KOFFEIN	19
1.3.1	Pharmakokinetik – LADME	20
1.3.2	Pharmakodynamik	23
1.3.3	Der Einfluss von chronischer Koffeinaufnahme auf das adenosinerge System im Hinblick auf die Schlaf–Wach–Regulation	24
1.3.4	Der Einfluss von chronischer Koffeineinnahme auf das adenosinerge System im Hinblick auf neuroprotektive Effekte	27
1.4	ZIEL DER ARBEIT	30
2	MATERIAL UND METHODEN	32
2.1	VERSUCHSTIERE	32
2.2	CHRONISCHE KOFFEINAPPLIKATION	32
2.3	NARKOSE	34
2.4	IN VIVO–QUANTIFIZIERUNG DER ZEREBRALEN A ₁ AR MITTELS PET	35
2.4.1	Prinzip der PET	35
2.4.2	Studiendesign	37
2.4.3	Allgemeine Durchführung	38
2.4.4	Radiotracer [¹⁸ F]CPFPX	39
2.4.5	Daten– und Bildauswertung	39
2.5	IN VIVO–QUANTIFIZIERUNG VON EXTRAZELLULÄREM ADENOSIN MITTELS MIKRODIALYSE	44
2.5.1	Prinzip der Mikrodialyse	44
2.5.2	Studiendesign	45
2.5.3	Dialysematerial	46
2.5.4	In vitro–Wiederfindungsrate	49

2.5.5	<i>Implantation der Führungskanülen</i>	51
2.5.6	<i>Postoperative Nachsorge</i>	53
2.5.7	<i>Versuchsapparatur (Mikrodialysebox)</i>	54
2.5.8	<i>Mikrodialytische Ableitung</i>	55
2.5.9	<i>In vitro–Untersuchungen</i>	57
2.5.10	<i>Analytik des Dialysats</i>	57
2.6	STATISTIK	60
3	ERGEBNISSE	63
3.1	ALLGEMEINE PARAMETER	63
3.2	DIE EFFEKTE EINER CHRONISCHEN KOFFEINGABE AUF DIE A ₁ AR–EXPRESSION IM ZNS DER RATTE MITTELS [¹⁸ F]CPFPX–PET	64
3.3	MIKRODIALYTISCHE ANALYSE DER ZIRKADIANEN ADENOSINERGER PROZESSE SOWIE VON DEREN KOFFEINBEDINGTEN VERÄNDERUNGEN IM ZNS DER RATTE	74
3.3.1	<i>Vorversuche</i>	74
3.3.2	<i>In vivo–Untersuchungen</i>	80
3.3.3	<i>In vitro–Untersuchungen</i>	85
4	DISKUSSION	87
4.1	DISKUSSION DER EXPERIMENTELLEN BEFUNDE	87
4.1.1	<i>In vivo–Quantifizierung der zerebralen A₁AR</i>	87
4.1.2	<i>In vivo–Quantifizierung von extrazellulärem Adenosin</i>	96
4.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE IM HINBLICK AUF NEUROPROTEKTIVE EFFEKTE VON CHRONISCHEM KOFFEINKONSUM	101
4.3	DISKUSSION DER VERWENDETEN METHODEN	105
4.3.1	<i>Tiermodell und die Übertragbarkeit auf den Menschen</i>	105
4.3.2	<i>Der Einsatz der PET</i>	107
4.3.3	<i>Der Einsatz der Mikrodialyse</i>	110
5	ZUSAMMENFASSUNG	114
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	116
7	LITERATUR	120

1 Einleitung

Der Mensch verbringt durchschnittlich ein Drittel seines Lebens im Schlaf. Die Ursachen der täglichen Oszillationen zwischen Schlaf und Wachsein sind jedoch im Wesentlichen unverstanden und stellen ein rasch wachsendes Feld der biochemischen, physiologischen sowie neurologischen Forschung dar. Die Notwendigkeit von Schlaf wird besonders durch chronische Defizitzustände deutlich, bei denen durch langfristigen Schlafmangel neben den Auswirkungen auf Stimmung und kognitive Leistungsfähigkeit auch die Entstehung chronischer Krankheiten wie Adipositas und Diabetes begünstigt wird (Estrada *et al.*, 2012).

Auf molekularer Ebene liegt dem Schlaf–Wach–Rhythmus ein selbstregulierender Prozess zugrunde, bei dem im Verlauf der Wachphase der homöostatische Druck bis zu einem Maximum ansteigt, das den Beginn des Schlafzustands markiert. Die biochemische Basis dieses Prozesses ist noch weitgehend unverstanden, dennoch gibt es begründete Annahmen, dass Adenosin als Neuromodulator an der Auslösung des Schlafsignals beteiligt ist (Kalinchuk *et al.*, 2011). Ein empirischer Beleg dafür ist es, dass durch Adenosin–antagonisierende Substanzen, wie z.B. Koffein, das Schlafbedürfnis reproduzierbar reduziert wird.

Neben seiner schlafbeeinflussenden Wirkung wurde in den letzten Jahren anhand mehrerer epidemiologischer Studien vermutet, dass langjähriger mäßiger Kaffeekonsum protektiv gegen neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson wirkt (van Gelder *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2007; Laurin *et al.*, 2004). Dabei konnte gezeigt werden, dass der chronische Konsum von 3 bis 5 Tassen Kaffee pro Tag das Risiko für Demenz (einschließlich der Alzheimer–Krankheit) um 65 bis 70 % reduziert (Eskelinen *et al.*, 2009). Derzeit gibt es jedoch weder experimentelle Befunde noch eine

konsistente Hypothese über die molekularen Mechanismen, die diesem offenkundig neuroprotektiven Effekt von Koffein zugrunde liegen. Folglich werden in der vorliegenden Arbeit die Funktion des Neuromodulators Adenosin und seines dominierenden Rezeptors (A_1 -Adenosinrezeptor, A_1AR) in der Schlaf–Wach–Regulation sowie deren Veränderungen unter chronischen Koffeinapplikation bei Ratten untersucht.

Zunächst werden jedoch die verschiedenen Schlafstadien, die beteiligten Hirnareale sowie die allgemeinen Regulationsmechanismen der Schlaf–Wach–Rhythmik vorgestellt. Es folgen die Charakterisierung des adenosinergen Systems und die Beschreibung seiner Rolle in der Schlaf–Wach–Regulation. Der letzte Abschnitt der Einleitung widmet sich dem Koffein in seiner Funktion als unselektiver Adenosinantagonist. Hier werden Pharmakokinetik und –dynamik sowie der Einfluss auf das adenosinerge System im Hinblick auf die Schlaf–Wach–Regulation dargestellt. Abschließend wird die aktuelle Befundlage zu Koffein als potenzielles Neuroprotektivum sowie Hypothesen über mögliche molekulare Wirkmechanismen vorgestellt.

1.1 Der Schlaf

Der Schlaf wird als schnell reversibler Zustand mit eingeschränktem Reaktionsvermögen und verändertem Bewusstsein definiert (Bear *et al.*, 2009). Er ist mit tierartspezifischen Unterschieden bei allen höheren Wirbeltieren nachweisbar.

Im Folgenden werden die verschiedenen Schlafstadien, die Schlaf–Wach–Regulation sowie die beteiligten Hirnareale dargestellt.

1.1.1 Schlafeinleitung

An der Schlafeinleitung sind die miteinander vernetzten Hirnareale des Hirnstamms, insbesondere die *Formatio reticularis* sowie Thalamus und zerebraler Kortex beteiligt. Die *Formatio reticularis* gehört mit seinen neuronalen Verknüpfungen, die von der *Medulla oblongata* bis ins Mittelhirn ziehen, zum aufsteigenden retikulären System (ARAS) und ist verantwortlich für die Kontrolle der Wachphase bzw. für die Schlafeinleitung (Peter *et al.*, 2007; Evans, 2003; Steriade, 1999). Das ARAS aktiviert mit noradrenergen und cholinergen Projektionen die thalamischen und kortikalen Areale (s. Abb. 1.1).

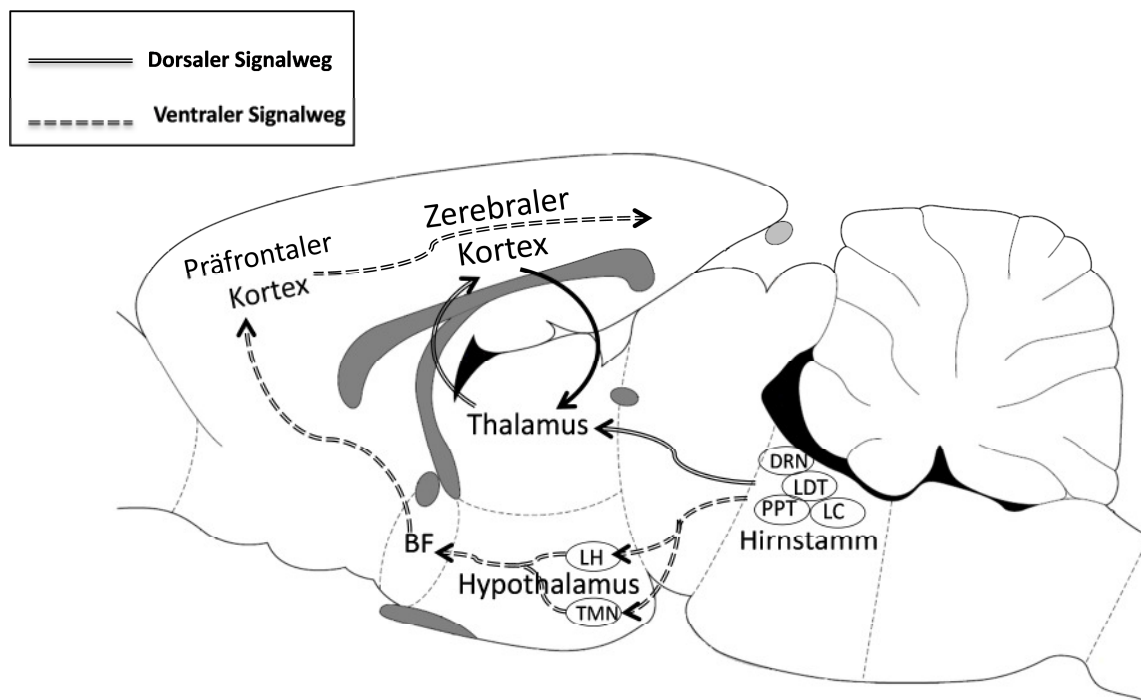


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des ARAS mit seinen ventralen und dorsalen Projektionsbahnen auf einer Sagittalansicht eines Rattenhirns.

Der Thalamus stellt den größten Teil des Zwischenhirns dar und ist an der Regulation des Bewusstseins und des Schlafs beteiligt. Es besteht aus zwei gleich großen Hälften mit mehr als hundert Kernen, die überwiegend aus Projektions- und Interneuronen bestehen. Abgesehen von den retikulären Thalamuskernen (NRT) sind alle Kerne stark und reziprok mit dem Kortex

verbunden. Im Allgemeinen gibt es verschiedene Unterteilungskriterien für die Kerne. Beispielsweise lässt sich der Thalamus nach Kolb und Whishaw (1996) grob in den ventralen und dorsalen Teil unterteilen. Während die ventralen Kerne unspezifisch in die kortikalen Regionen projizieren, finden im dorsalen Teil des Thalamus spezifische Projektionen statt. Des Weiteren lassen sich die thalamischen Kerne anhand ihrer Funktionalität in Relais-, Assoziations- und unspezifische Kerne einteilen. Die sogenannten Relaiskerne erhalten ihre Informationen aus der Peripherie und leiten diese an den Kortex weiter. Die wesentlichen Relaiskerne sind der *Nucleus ventralis posterior* (VP), der *Nucleus ventralis anterior thalami* (VA) und der *Nucleus ventralis lateralis thalami* (VL). Der VP-Kern gehört zum somatosensorischen System und leitet die empfangenen Sinnesinformationen an zahlreiche Bereiche des Kortex, im Wesentlichen an den *Gyrus postcentralis*, weiter (Llinas und Steriade, 2006; Kaufman *et al.*, 1984). Der VA-Kern ist stark mit den Basalganglien, insbesondere dem *Globus pallidus* und der *Substantia nigra*, verknüpft und projiziert motorische Signale zum Motorkortex. Im Gegensatz zum VA-Kern ist der VL-Kern weniger stark mit den Basalganglien verbunden, wirkt aber in ähnlicher Weise als Relaiskern zwischen Kleinhirn und Motorkortex (Jones, 2004). Assoziationskerne, wie das *Pulvinar*, verbinden verschiedene kortikale Areale untereinander (Kaufman *et al.*, 1984). Diese Kerne sind ein Teil einer Rückkopplungsschleife, bei der zahlreiche Informationen vom Kortex reziprok zurückgesendet werden. Demgegenüber stehen die unspezifischen Thalamuskern, die nur schwache und diffuse Verbindungen zum Kortex bilden. Ihre Signale erhalten sie hauptsächlich von der *Formatio reticularis* des Hirnstamms, dem Kleinhirn und den Basalganglien (Krebs *et al.*, 2011).

Ihre Neurotransmitter-assoziierte Aktivierung erfolgt unter anderem durch Acetylcholin-(ACh)-haltige (cholinerge) Neurone des Hirnstammes (insbesondere des *pedunculo pontinen Nucleus* (PPT) und des *laterodorsalen*

tegmentalen Nucleus (LDT)). Diese geben ihre Signale über den dorsalen Signalweg an die Thalamuskern weiter und münden in verschiedenen Bereichen des Kortex. Über den ventralen Signalweg projizieren die cholinergen Neurone indirekt zum Thalamus über das basale Vorderhirn (BF), den lateralen Hypothalamus (LH) oder den *Nucleus tuberomammillaris* des Hypothalamus (TMN) (Hallanger *et al.*, 1987; Steriade *et al.*, 1988) (vgl. Abb. 1.1). Beide Kerne wiederum innervieren das BF, das seinerseits in den Kortex projiziert (Zaborszky *et al.*, 1999). Neben den cholinergen Neuronen umfasst das ARAS zusätzlich glutamaterge und noradrenerge Projektionen aus dem *Locus coeruleus* (LC) und serotonerge Projektionen aus dem dorsalen Raphekern (DRN).

1.1.2 Schlafstadien

Der Schlaf stellt einen rhythmischen Prozess dar, in dessen Verlauf sich verschiedene Schlafphasen zyklisch aneinanderreihen. Ein Zyklus dauert ca. 90 Minuten und wird 3 bis 5 Mal pro Nacht wiederholt (Bear *et al.*, 2009). Der Schlaf von Säugetieren wird aufgrund von Phasen mit raschen Augenbewegungen in NREM– (*Non Rapid Eye Movement*) und REM– (*Rapid Eye Movement*) Schlaf unterteilt. Beide Phasen sind zusätzlich durch typische Muster in der Elektroenzephalographie (EEG) gekennzeichnet. Während der NREM–Schlaf $\frac{3}{4}$ des Gesamtschlafes ausmacht, nimmt die Länge der vergleichsweise kurzen REM–Schlafphasen in der zweiten Nachthälfte deutlich zu.

REM–Schlaf, der aufgrund seiner EEG–Charakteristika auch als paradoxer oder desynchronisierter Schlaf bezeichnet wird, wird durch cholinerge Neuronen des *Pons* ausgelöst. Namensgebend und charakteristisch für den REM–Schlaf sind seine schnellen Augenbewegungen bei geschlossenen Augenlidern (Aserinsky und Kleitman, 1953). Mit Ausnahme der Augen– und Atemmuskulatur ist die

Skelettmuskulatur weitgehend gelähmt (Atonie) (Bear *et al.*, 2009). Im REM–Schlaf–EEG sind ähnlich hochfrequente Alphawellen (8 – 12 Hertz) mit niedriger Amplitude wie im EEG des wachen Gehirns zu erkennen („paradoxe Schlaf“). Darüber hinaus findet wie im wachen Gehirn eine cholinerge Ausschüttung im LDT und PPT statt, die wiederum den Thalamus und die nachgeschalteten kortikalen Areale aktivieren. Dem gegenüber stehen die Monoamine Serotonin, Noradrenalin, Histamin und Dopamin, die primär in der Wach– und NREM–Phase ausgeschüttet werden. Die ausbleibende Ausschüttung während des REM–Schlafes ist auf die Inhibition durch γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin zurückzuführen (für weitere Informationen, vgl. McCarley und Hobson (1975)).

Im Gegensatz zum REM–Schlaf finden während der NREM–Schlafphase nur wenige Augenbewegungen statt. Nach den Kriterien der American Academy of Sleep Medicine (2007) lässt sich die NREM–Phase in drei Stadien unterteilen (Iber *et al.*, 2007): Stadium N1 und N2 (Leichtschlafphase) und N3 (Tiefschlafphase, auch „*Slow Wave Sleep*“, SWS). Der Übergang vom Wachsein in den Schlaf (N1) ist durch die zunehmende Bewusstseinseinschränkung und das schrittweise Auflösen der für den Wachzustand typischen Alphawellen charakterisiert. Darüber hinaus formen sich in dieser Phase die kleinen und langsamen Theta–Wellen (4 – 7 Hz). Das Stadium N2 stellt den faktischen Schlafbeginn mit seinen charakteristisch intermittierenden Schlafspindeln und K–Komplexen dar. Schlafspindeln sind als hochfrequente Oszillationen (8 – 14 Hz) mit einer Mindestdauer von 50 Millisekunden definiert. K–Komplexe hingegen stellen niederfrequente (1 – 2 Hz), aber hochamplitudige biphasische Wellen dar (Bear *et al.*, 2009). In Stadium N3 treten vermehrt Tiefschlaf–typische Deltawellen, die durch hohe Amplituden und niedrige Frequenzen (< 4 Hz) gekennzeichnet sind, auf. Die langsamen Tiefschlaf–Delta–Wellen sind

auf die thalamische Synchronisation des Kortex zurückzuführen (Maquet, 2010).

1.1.3 Schlaf–Wach–Regulation

Die Schlaf–Wach–Regulation kann nach dem sog. Zwei–Prozess–Modell von Borbely (1982) beschrieben werden (vgl. Abb. 1.2).

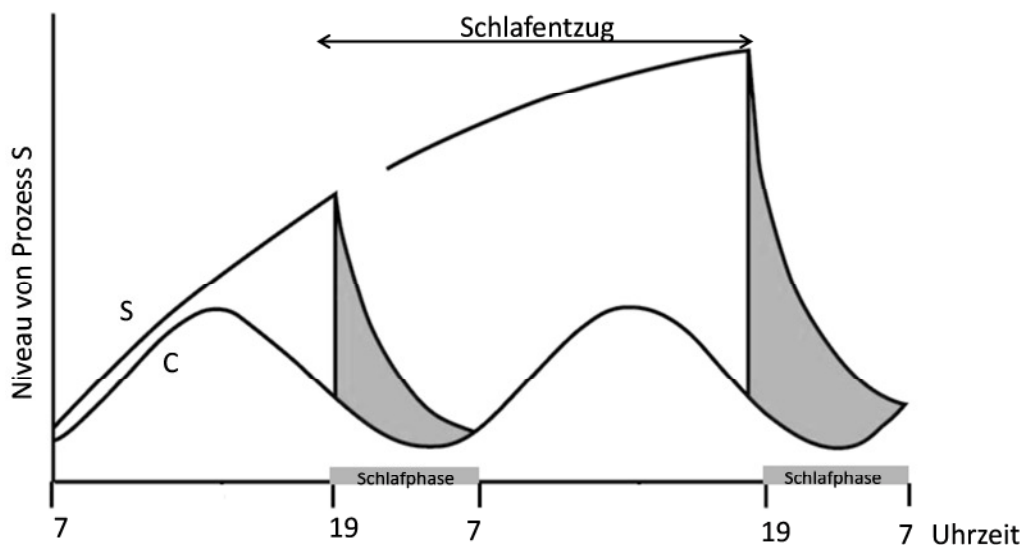


Abb. 1.2: Zwei–Prozess–Modell nach Borbely (1982).

In diesem Modell werden die Prozesse der zirkadianen Schlafbereitschaft (Prozess C) und des homöostatischen Schlafdrucks (Prozess S) integriert. Zwischen der Wachheit und der anschließenden Tiefschlafphase besteht ein linearer Zusammenhang, der sich im sog. homöostatischen Schlafdruck widerspiegelt. Dabei steigt die Tiefschlafmenge proportional zur Dauer der vorangegangenen Wachheit an. Die zirkadiane Schlafbereitschaft hingegen gilt als schlafunabhängige Komponente und erzeugt, angepasst an den äußeren Licht–Dunkel–Zyklus, einen eigenen Schlaf– bzw. Wachdruck. Theoretisch könnte daher trotz eines hohen homöostatischen Schlafdrucks (z. B. in den Abendstunden) eine maximale Wachheit bis in die Morgenstunden durch die zirkadiane Schlafbereitschaft erzeugt werden. Tatsächlich aber steigt nach einer Nacht ohne Schlaf, im wissenschaftlichen Kontext auch Schlafentzug (SD,

sleep deprivation) genannt, der homöostatische Schlafdruck. Dadurch wird der sich anschließende Erholungsschlaf intensiver, jedoch nur minimal länger als der Normalschlaf, so dass die generelle Schlaf–Wachrhythmik beibehalten wird.

Das Zwei–Prozess–Modell von Borbely (1982) macht Aussagen über prinzipielle Mechanismen, jedoch nicht über konkrete physiologische Prozesse. Auf molekularer Ebene beeinflussen daher verschiedene Substanzen den Schlaf–Wach–Rhythmus. Diese sogenannten schlafregulierenden Substanzen erhöhen definitionsgemäß nach Borbely und Tobler (1989) die Schlafbereitschaft. Im Gegenzug führt deren Inaktivierung zu einer Verringerung der spontanen Schlafrate. Darüber hinaus variieren ihre Konzentrationen innerhalb des Schlaf–Wach–Zyklus bzw. in verlängerten Wachphasen. Das bekannteste Beispiel für eine schlafregulierende Substanz stellt der Neuromodulator Adenosin, der im Kapitel 1.2.1 noch ausführlicher besprochen wird, dar.

1.2 Das adenosinerge System

1.2.1 Adenosin

Adenosin ist ein ubiquitär vorkommendes Purinnukleosid. Es besteht aus Adenin und β -D-Ribose–Zucker und ergibt durch Anbringen von drei Phosphaten das energiereiche Adenosintriphosphat (ATP). Mono– oder Diphosphorylierte Moleküle bilden das energieärmere Adenosindi– (ADP) und –monophosphat (AMP) (Huang *et al.*, 2011). Die geringen Modifikationen des Adenosins führen zu den unterschiedlichsten Funktionen. Während ATP den wichtigsten Energieträger des Zellmetabolismus darstellt, ist zyklisches AMP (cAMP) als *second messenger* in der Signaltransduktion beteiligt. Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Konzentrationsbereich von Adenosin 30 bis 300 nM (Daly und Fredholm, 1998). Im Zentralnervensystem (ZNS)

entfaltet Adenosin über die Aktivierung seiner Rezeptoren zahlreiche neuromodulatorische Eigenschaften, die in Kapitel 1.2.3 näher beschrieben werden.

1.2.2 Synthese und Metabolismus

Adenosin gehört im Gegensatz zu ATP nicht zu den klassischen Neurotransmittern. Bekanntermaßen erfüllt Adenosin das Kriterium der vesikulären Ausschüttung nicht, sondern wird durch Transporter atypisch in den extrazellulären Raum abgegeben (Burnstock, 2007). Aus diesem Grund zählt Adenosin zu der Gruppe der Neuromodulatoren. Adenosin wird entlang seines Konzentrationsgefälles über bidirektionale Nukleosidtransporter durch die Membran geschleust. Der passive Transportmechanismus gewährleistet dabei die Aufrechterhaltung des intra- und extrazellulären Gleichgewichtes von Adenosin (Dunwiddie und Masino, 2001; Huang *et al.*, 2011; Latini und Pedata, 2001; Fredholm *et al.*, 1999) (vgl. Abb. 1.3).

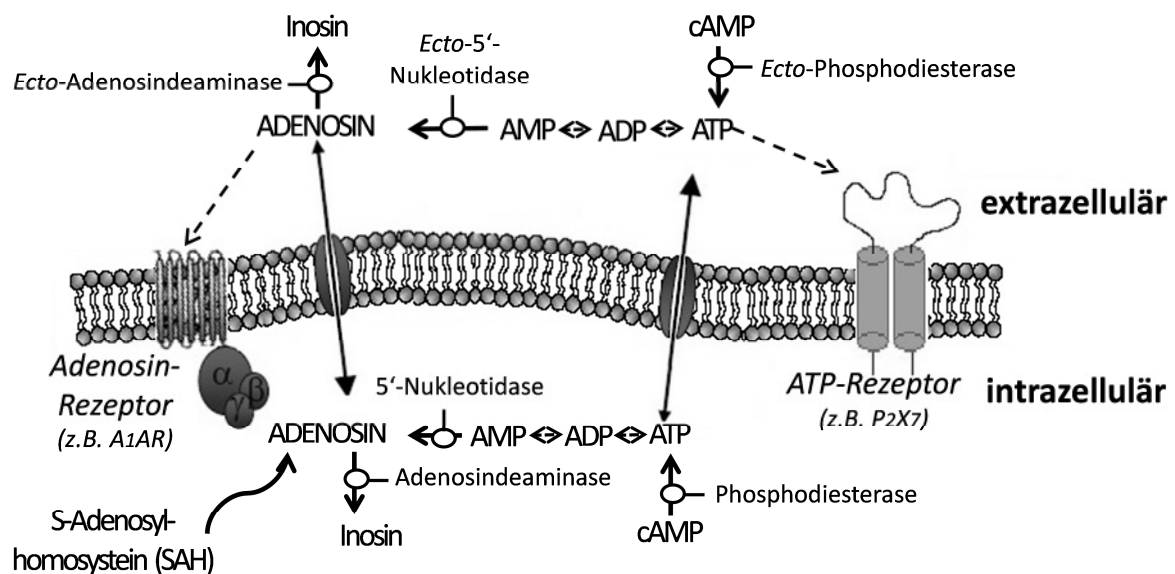


Abb. 1.3: Der intra- und extrazelluläre Transport und Metabolismus von Adenosin und seinen Metaboliten (nach Duda und Dietrich (2008)).

Intrazellulär wird Adenosin in Form von S-Adenosylhomocystein (SAH) gespeichert. Bei Bedarf findet die Hydrolyse von SAH zu intrazellulärem Adenosin mit L-Homocystein als Nebenprodukt statt (Latini und Pedata, 2001). Des Weiteren wird sowohl intra- als auch extrazelluläres Adenosin durch die Degradation von AMP über ADP und ATP generiert. Im letzten Umwandlungsprozess, welcher intrazellulär durch das Enzym 5'-Nukleotidase und extrazellulär durch die jeweilige Ekto-Nukleotidase erfolgt, wird die letzte energiereiche Phosphatgruppe des AMP abgespalten und Adenosin gebildet. Die Hemmung dieser Umwandlungsprozesse sowie der zelluläre Abbau von ATP führen zu einem Anstieg von extrazellulärem Adenosin (Britton *et al.*, 1999; Radek *et al.*, 2004; Dunwiddie *et al.*, 1997). Darüber hinaus kann Adenosin aus cAMP über ATP durch das Enzym Phosphodiesterase bzw. durch die extrazellulär vorhandene Ekto-Phosphodiesterase gebildet werden. Abschließend kann Adenosin durch die (Ekto-)Adenosindeaminase zu Inosin umgewandelt werden.

Eine weitere Quelle für Adenosin sind Gliazellen (Halassa *et al.*, 2009). Die Freisetzung beginnt hier mit der Ausschüttung von Neurotransmittern, wie z.B. Glutamat, die zu einer synaptischen Aktivierung von Astrozyten führt. Der durch die synaptische Aktivierung ausgelöste Calciumanstieg löst wiederum eine SNARE-abhängige Gliatransmission von ATP und anderen Neurotransmittern aus (Agulhon *et al.*, 2012). Die Hauptfunktion des SNARE-Komplexes (*Soluble N-ethylmaleimid-sensitive-factor attachment receptor*) ist die vesikuläre Freisetzung verschiedener Neurotransmitter über Membranfusion. Dabei bilden die SNARE-Proteine mit der Plasmamembran einen stabilen Komplex, der ausschließlich unter ATP-abhängiger Hydrolyse durch NSF (*N-ethylmaleimid-sensitive-factor*) dissoziiert werden kann (Furst *et al.*, 2003). Abschließend wird nach seiner Freisetzung ATP schnell und enzymatisch in Adenosin umgewandelt (Dunwiddie *et al.*, 1997; Jones, 2009).

1.2.3 Adenosinrezeptoren

Im ZNS vermittelt Adenosin seine zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozesse über membranständige, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, den Adenosinrezeptoren (Fredholm *et al.*, 2001; Stone, 1991). Diese Rezeptoren gehören zur Gruppe der P_1 -Purinrezeptoren, den sogenannten Nukleosidrezeptoren, und werden in vier Subtypen, den A_1 -, A_{2A} -, A_{2B} - und A_3 -Adenosinrezeptor unterteilt (vgl. Abb. 1.4).

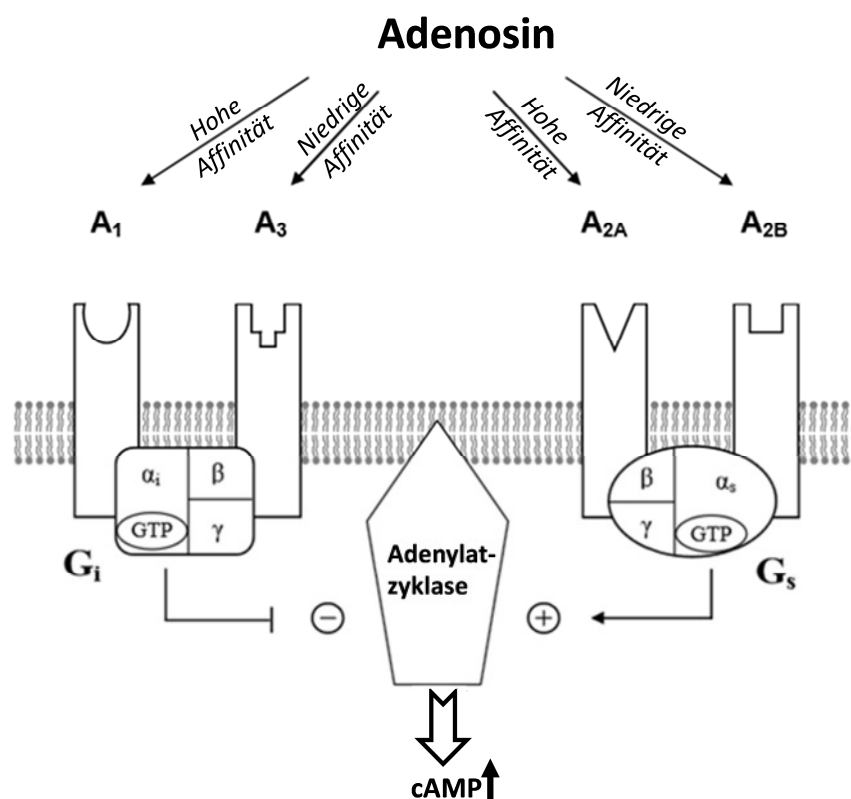


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Adenosinrezeptoren bei der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion nach Ledderose (2007).

Die verschiedenen Subtypen variieren unter anderem bei ihrer Rolle im Rahmen der Signalübertragung. Aktivierte A_1 - und A_3 -Adenosinrezeptoren wirken inhibierend über G_i -Proteine auf die membranständige Adenylatzyklase ein und erniedrigen somit die cAMP-Synthese. Aktivierte A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren hingegen stimulieren über G_s -Proteine die

Adenylatzyklase, die wiederum die cAMP-Konzentration ansteigen lässt (Fredholm *et al.*, 2001). Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A, die wiederum die Serin- und Threoninreste bestimmter Proteine phosphoryliert und auf diesem Wege verschiedene Zellreaktionen auslöst (Lüllmann *et al.*, 2010).

Des Weiteren lassen sich die verschiedenen Subtypen neben den molekularen Unterschieden anhand ihrer Affinität und Verteilung klassifizieren. Hochaffin bindet das Adenosin an die A₁- und A_{2A}-Adenosinrezeptoren an, wohingegen die A_{2B}- und A₃-Adenosinrezeptoren erst in mikromolaren, also unphysiologisch hohen Konzentrationen aktiviert werden (bspw. während eines epileptischen Anfalls oder in einem Tumor). Daher wird den A_{2B}- und A₃-Adenosinrezeptoren eine Rolle bei pathophysiologischen Zuständen zugeschrieben, die jedoch im Einzelnen noch weitgehend ungeklärt sind (Rudolphi und Schubert, 1997). Im ZNS werden vor allem der A₁-, sowie der A_{2A}-Adenosinrezeptorsubtyp exprimiert. Während der A₁AR ubiquitär und in hoher Dichte in Hippokampus, Kortex und Zerebellum vorkommt (Fastbom *et al.*, 1987b; Fastbom *et al.*, 1987a), beschränkt sich der A_{2A}AR überwiegend auf das Striatum (Nucleus (Ncl.) accumbens, Caudatus Putamen) (Jarvis *et al.*, 1989; Dixon *et al.*, 1996).

Adenosin löst im ZNS über den A₁AR und A_{2A}AR zahlreiche komplexe Funktionen aus. Neben seiner schlaffördernden Wirkung (Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997) ist Adenosin unter anderem an der Entstehung von Angst (Jain *et al.*, 1995) und Schmerz (Ferrari *et al.*, 2015) beteiligt. Auf molekularer Ebene hemmt Adenosin die Freisetzung von diversen Neurotransmittern wie z.B. Acetylcholin, Dopamin und Glutamat (Fredholm und Dunwiddie, 1988), was zur Herabsetzung der neuronalen Erregbarkeit führt (Dunwiddie und Masino, 2001).

1.2.4 Das adenosinerge System und seine Rolle in der Schlaf–Wach–Regulation

Als schlaffördernde Substanz trägt Adenosin über seine Rezeptoren entscheidend zu der Steuerung des von Borbely (1982) beschriebenen homöostatischen Schlafdrucks (Prozess S) bei (Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997). Nachfolgend wird die Schlüsselrolle des adenosinergen Systems in der Schlaf–Wach–Regulation diskutiert und Stickstoffoxid (NO_x) als weitere schlafregulierende Substanz vorgestellt.

1. Der Einfluss von schlafregulierenden Substanzen und ihrer Metabolite auf den Schlaf–Wach–Rhythmus

NO_x spielt als schlafregulierende Substanz eine entscheidende Rolle im Schlaf–Wach–Rhythmus (Kalinchuk *et al.*, 2011). Im Kortex von Ratten konnte gezeigt werden, dass extrazelluläres NO_x während der Wachphase im Vergleich zu SWS und REM–Schlaf die höchste Konzentration aufweist (Cespuglio *et al.*, 1996). Im Einzelnen konnte das extrazelluläre Anfluten von NO_x in verlängerten Wachphasen bzw. unter SD zunächst im BF und anschließend zeitverzögert (ca. 6 Stunden später) im frontalen Kortex (FC) nachgewiesen werden (Kalinchuk *et al.*, 2011). Diese kaskadenartigen Effekte sind auf die NOS–(Stickstoffoxid–Synthetase, *Nitric oxide synthetase*) enthaltenden Projektionsneuronen zurückzuführen (Abb. 1.1) (Williams *et al.*, 1997). Diese Projektionsneurone sind größtenteils cholinergischer Art und durch die Freisetzung von NOS für die kortikale Aktivierung verantwortlich (Vazquez *et al.*, 2002). Im Wesentlichen wird der SD–induzierte Anstieg von NO_x durch die induzierbare NO–Synthase (iNOS), welche sowohl auf der Transkriptions– als auch auf der Translationsebene verändert wird, vermittelt (Kalinchuk *et al.*, 2011; Aktan, 2004; Kalinchuk *et al.*, 2006). Darüber hinaus führt der SD–induzierte Anstieg von NO_x zu einer höheren Schlafbereitschaft, jedoch gleichzeitig die Inhibition

der iNOS zur Vermeidung des NREM-Erholungsschlafes (Steriade, 1995). Diese beobachteten Effekte konnten in iNOS-Knockout-Mäusen, die während der Baseline-Schlafphase eine signifikant erhöhte REM-Phase und während der Aktivphase eine signifikante Verringerung des NREM-Schlafes vorwiesen, bestätigt werden (Chen *et al.*, 2003).

Zusätzlich zu den cholinergen Neuronen im BF wird NO_x im Thalamus zirkadian freigesetzt (Vincent *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1997). Der in der Wachphase hervorgerufene NO_x-Anstieg im Thalamus wird analog zum BF durch cholinerge NOS-Neurone hervorgerufen. Diese Neurone projizieren den aus dem Hypothalamus, LDT und PPT empfangenen Input an den Thalamus (Vincent und Kimura, 1992). Diese Befunde konnten durch elektrische Stimulationsversuche im LDT, die als Reaktion eine erhöhte thalamische NO_x-Freisetzung hervorriefen, bestätigt werden (Miyazaki *et al.*, 1996; Vincent und Kimura, 1992).

Der zuvor beschriebene kaskadenartige Anstieg von extrazellulärem NO_x steht in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten Adenosinkonzentration. Die glutamaterge Stimulation von cholinergen Neuronen im BF führt zu einem Anstieg von extrazellulärem Adenosin und folglich zu Schlaf (Wigren *et al.*, 2007). Allerdings verhindern Läsionen an diesen spezifischen Nervenzellen den SD-induzierten Anstieg von Adenosin (Blanco-Centurion *et al.*, 2006). Dementsprechend kann angenommen werden, dass entweder die cholinergen Neurone selbst oder die Freisetzung ihrer Signalmoleküle, wie z.B. NO_x, für die Anreicherung von Adenosin verantwortlich sind.

Wie bereits erwähnt stellt Adenosin die bedeutendste, endogen schlaffördernde Substanz dar (Borbely und Tobler, 1989). Während Adenosin in Wachphasen, und zwar besonders in verlängerten Wachphasen (z.B. unter SD), akkumuliert und auf diese Weise den resultierenden homöostatischen

Schlafdruck erhöht, wird es in den sich anschließenden Schlafphasen sukzessiv wieder abgebaut (Porkka-Heiskanen *et al.*, 1997; Porkka-Heiskanen *et al.*, 2000; Huston *et al.*, 1996). Analog zu NO_x wird der extrazelluläre Adenosinspiegel in Ratten unter SD arealspezifisch verändert (vgl. Abb. 1.5). Dabei steigt der Adenosinspiegel progressiv mit zunehmender Wachheit zunächst im BF und anschließend zeitverzögert nach 6 Stunden im FC an (Kalinchuk *et al.*, 2011). Dieser schlafentzugsbedingte Anstieg des Adenosins ist um ca. 40% gegenüber dem physiologischen Pegel erhöht und wird während des sich anschließenden Erholungsschlafes schrittweise vermindert. Es wird vermutet, dass die kaskadenartigen und arealspezifischen Veränderungen von Adenosin und NO_x durch die anatomisch bedingten Projektionen des BF zum FC verursacht werden (vgl. 1.1.1). Dem gegenüber steht jedoch die thalamische, extrazelluläre Adenosinkonzentration in Katzen, die stetig und ohne Regeneration von SD bis zum Erholungsschlaf absinkt (Porkka-Heiskanen *et al.*, 2000). Der molekular-kausale Zusammenhang ist noch ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Möglicherweise stellt der kontinuierliche Abfall eine artspezifische Besonderheit dar und ist auf eine erhöhte Rezeptorexpression im Thalamus bei Katzen im Vergleich zum BF zurückzuführen. Folglich würden die zusätzlich vorhandenen Rezeptoren dem erhöhten Adenosinspiegel im Thalamus entgegenwirken.

Neben NO_x und Adenosin unterliegt das energiereiche ATP ebenfalls zirkadianen Schwankungen (Womac *et al.*, 2009; Marpegan *et al.*, 2011). Tageszeitunabhängig verbleibt die extrazelluläre ATP-Konzentration während der Wachphase in einem *steady-state*-ähnlichen Zustand. In den ersten Stunden des Schlafes jedoch steigt ATP ruckartig mit einem Maximum bei drei Stunden an (vgl. Abb. 1.5) (Dworak *et al.*, 2010). Interessanterweise tritt dieses Phänomen vor allem in Hirnregionen mit wachaktiven Neuronen (z.B. BF, FC und Hippokampus) auf und nicht in schlafaktiven Regionen wie dem

Nucleus preopticus ventrolateralis des Hypothalamus (VLPO). Darüber hinaus wird der ruckartige ATP-Anstieg, der positiv mit der NREM-Delta-Aktivität im EEG korreliert ist, durch SD verhindert und erst zeitverzögert im anschließenden Erholungsschlaf ausgelöst. Im BF fand der verzögerte Erholungsschlaf nach drei und im Kortex nach sechs Stunden statt (Dworak *et al.*, 2010)

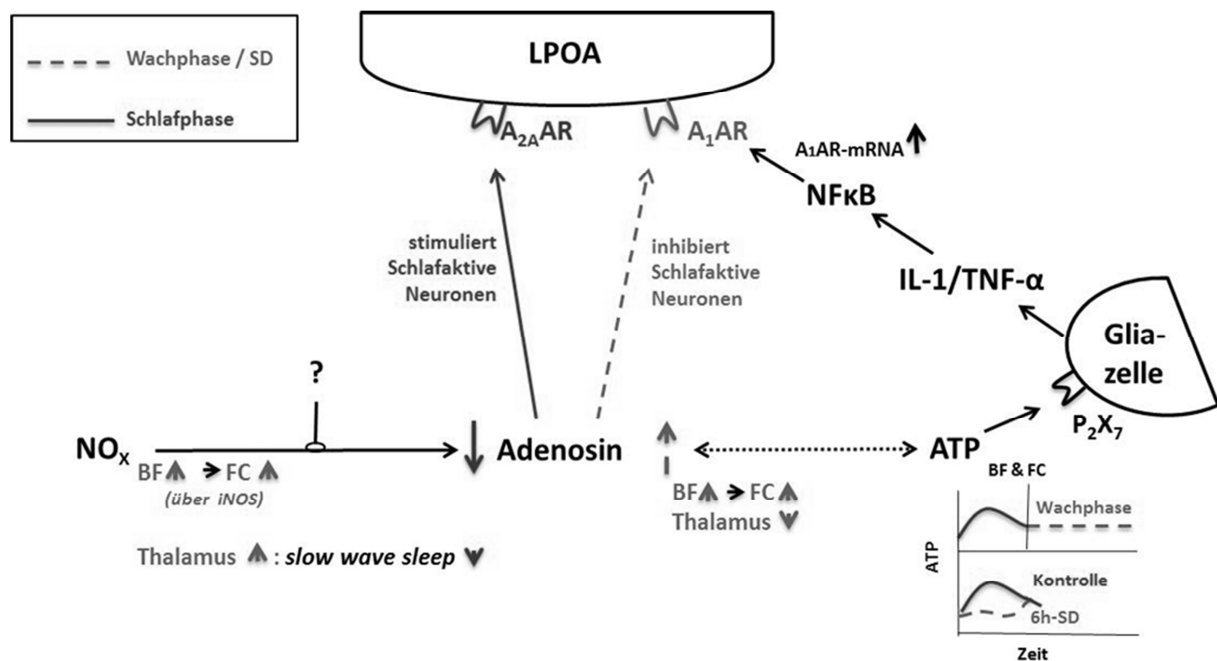


Abb. 1.5: Schematischer Überblick der schlafregulierende Substanzen und Metabolite im Schlaf-Wach-Rhythmus und unter Schlafentzug (SD).

Neben seiner Rolle in der Neuro- und Gliatransmission (vgl. 1.2.2) induziert ATP die Freisetzung von Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1) oder Tumornekrosefaktor α (TNF- α) über gliale P_2 -Rezeptoren (z.B. P_2X_7). Im Gegenzug induzieren diese wiederum NREM-Schlaf (Krueger *et al.*, 2008). Darüber hinaus aktiviert das proinflammatorische Zytokin IL-1 den nukleären Transkriptionsfaktor kappa B (NF- κ B), welcher unter anderem die Transkriptionsrate des A_1 AR erhöht (Krueger *et al.*, 2010). Diese Modifikationen führen zu langfristigen Sensitivitätsänderungen des Rezeptors gegenüber Adenosin. Analog zu seinem präsynaptischen Liganden unterliegen die ZNS-relevanten Adenosinrezeptoren (A_1 AR und A_{2A} AR) zirkadianen Schwankungen,

die durch SD verstärkt dargestellt werden können. Nachfolgend wird die Rolle der Adenosinrezeptoren in der Schlaf–Wach–Regulation diskutiert.

II. Der Einfluss der Aktivierung des A₁AR auf den Schlaf–Wach–Rhythmus

Adenosin vermittelt seine Schlaf–Wach–regulatorischen Effekte vorwiegend über die gegensätzlich gekoppelten A₁AR und A_{2A}AR (G_i vs. G_s) (Rosati *et al.*, 1993; Heller, 2006). Daher führt ihre Aktivierung zu entgegengesetzten elektrophysiologischen Effekten, wie bereits im lateralen präoptischen Areal (LPOA) beobachtet werden konnte. Über den G_i-gekoppelten A₁AR werden die schlafaktiven Neurone des LPOA gehemmt und somit Wachheit induziert. Dem gegenüber steht der exzitatorische A_{2A}AR, der Schlaf durch die Stimulation derselben Neuronen erzeugt (s. Abb. 1.5) (Methippara *et al.*, 2005). Im Allgemeinen ist davon auszugehen, dass die schlaffördernde Wirkung von Adenosin überwiegend über den A₁AR vermittelt wird. Dies ist primär damit begründet, dass zum einen der A₁AR ubiquitär in verschiedenen Hirnarealen und nicht nur im Striatum (wie der A_{2A}AR) vorkommt und zum anderen Schlaf ein globales und arealüberschreitendes Phänomen darstellt. Aus diesem Grund fokussiert sich diese Arbeit auf den A₁AR–bedingten Einfluss auf den Schlaf–Wach–Rhythmus.

Wie bereits erwähnt unterliegt der A₁AR ebenfalls zirkadianen Schwankungen und wird analog zu seinem Liganden Adenosin im Wachzustand vermehrt exprimiert und in der anschließenden Schlafphase wieder herunterreguliert (Florio *et al.*, 1991; Rosati *et al.*, 1993; Virus *et al.*, 1984; Basheer *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Expressionsrate sowohl bei Ratten als auch bei Menschen während des SDs beobachtet werden (Elmenhorst *et al.*, 2009; Elmenhorst *et al.*, 2007). Im Einzelnen konnte nicht nur eine Aufregulierung der A₁AR–Dichte von Ratten im BF (14%) (Basheer *et al.*, 2007), sondern auch in den kortikalen Bereichen (20%) (Yanik und

Radulovacki, 1987) und im Thalamus (11%) detektiert werden (Elmenhorst *et al.*, 2009; Elmenhorst *et al.*, 2007). Diese Befunde widersprechen der Hypothese, dass der Anstieg von Adenosin während SD zur Internalisierung der Rezeptoren aufgrund von anhaltender Rezeptorstimulation führt. Neben der SD bedingten Zunahme des A₁A-Rezeptorproteins, wird die A₁AR-mRNA als Vorstufe ebenfalls dem erhöhten Bedarf angepasst und dementsprechend aufreguliert (Basheer *et al.*, 2007). Dieser zusätzliche Mechanismus gewährleistet bereits auf der Transkriptionsebene, dass in Phasen anhaltenden Schlafmangels und dem damit verbundenen exponentiellen Anstieg der Adenosinkonzentration entgegengewirkt wird. Die angepasste bzw. erhöhte Rezeptordichte sichert somit die Wiederherstellung der homöostatischen Bedingungen.

Mithilfe zahlreicher Agonisten konnten die schlaffördernden Wirkungen des Adenosins artifiziell reproduziert werden. Hierzu wurde beispielsweise der A₁AR-selektive Agonist N₆-Cyclohexyladenosin in die schlafrelevanten Hirngebiete des BF (Murillo-Rodriguez *et al.*, 2004; Thakkar *et al.*, 2003) oder dem perifornikalen-lateralen Hypothalamus (Alam *et al.*, 2009) verabreicht. In diesem Zusammenhang konnte folglich eine gesteigerte Schlafbereitschaft registriert werden. Des Weiteren konnte die entscheidende Rolle des adenosinergen Systems in der Schlafregulation durch die Applikation von Adenosin selbst bestätigt werden. Beispielsweise führte die Perfusion von Adenosin (300 µM) ins BF zur Reduktion der Wachheit um 25 % und zum Anstieg von REM-Schlaf um 250 % (Portas *et al.*, 1997). Dem gegenüber stehen die A₁AR-selektiven Antagonisten (z.B. 8-Cyclopentyl-1, 3-dimethylxanthin), die die Adenosin bedingte Abnahme der Wachphase revidieren (Gass *et al.*, 2009). Die bekannteste Rolle bei der täglichen Schlaf-Wach-Regulation spielt der nicht-selektive Adenosinantagonist Koffein. Im folgenden Abschnitt (1.3)

wird sein Einfluss auf die Schlaf–Wach–Regulation und seine potentiell neuroprotektive Wirkung dargestellt.

1.3 Koffein

Hundert Millionen Menschen weltweit konsumieren täglich Koffein in Form von Kaffee oder Tee. In Deutschland wird kein anderes Getränk häufiger genossen als Kaffee. Im Jahr 2013 trank jeder Deutsche durchschnittlich 165 Liter Kaffee pro Jahr, was ca. 2 bis 4 Tassen Kaffee pro Tag (d) entspricht (Deutscher Kaffeeverband, 2013). Dem stetig steigenden Konsum angepasst, erhöhte sich die Koffeinproduktion in den letzten Jahren auf ca. neun Millionen Tonnen weltweit. Koffein wurde erstmalig im Jahre 1820 von Ferdinand Runge auf Anweisung von Johann Wolfgang von Goethe aus Kaffeebohnen isoliert. Das gewonnene weiß–kristalline, geruchsneutrale und bitter schmeckende Pulver konnte im Jahre 1875 von Ludwig Medicus als 1,3,7–Trimethylxanthin identifiziert werden.

Im Wesentlichen kommt Koffein im Samen der *Coffea arabica* und *Coffea robusta* zu maximal 3 % und in Teeblättern der *Camellia sinensis* (grüner bzw. schwarzer Tee) zu maximal 4 % vor. Darüber hinaus konnte Koffein aus der Kolanuss, der *Cola nitida*, und der Kakaoschote, *Theobroma cacao* extrahiert werden (Ebermann und Elmadfa, 2008). Folglich tritt Koffein in verschiedenen Produkten in unterschiedlich konzentrierter Form auf. Nachfolgend ist der Koffeingehalt der gängigsten Koffein–enthaltenden Produkte dargestellt.

Tabelle 1.1: Koffeingehalt von Getränken nach European Food Information Council (2007)

Koffeinhaltiges Produkt	Koffeingehalt pro Tasse (150 mL)	Konzentration (g/L)
Kaffee	100 mg	0,67
Tee	30 mg	0,20
Cola	ca. 15 mg	0,10
Kakao	4 mg	0,03

Neben seiner prägenden Rolle als Genussmittel, wird Koffein zusätzlich in diversen klinischen Therapien angewendet. Beispielsweise wird Koffein bei Frühgeborenen mit Apnoe und Bradykardie eingesetzt (AWMF, 2010). Des Weiteren verbessert Koffein nicht nur die Motorik bei Morbus Parkinson (Postuma *et al.*, 2012), sondern wird auch als Neuroprotektivum gegenüber Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer angesehen (Qi und Li, 2014; Chuo *et al.*, 2007). Dieser neuroprotektive Zusammenhang wird in Kapitel 1.3.4 ausführlicher dargelegt.

1.3.1 Pharmakokinetik – LADME

Liberation (L) und Absorption (A)

Nach der oralen Aufnahme von reinem Koffein wird dieses schnell und nahezu vollständig in Mensch und Tier resorbiert. Jedoch wird die Absorption von Koffein in Form von Kaffee beim Menschen als unvollständig beschrieben (Morgan *et al.*, 1982). Nach oraler Aufnahme des reinen Koffeins wird beim Menschen die annähernd maximale Koffeinkonzentration (99%) innerhalb von 45 Minuten (Blanchard und Sawers, 1983; Bonati *et al.*, 1982; Arnaud und Welsch, 1980) und beim Tier ungefähr nach 60 bis 120 Minuten (Arnaud, 1976; Arnaud, 1993) erreicht. Die Pharmakokinetik von Koffein ist applikationsunabhängig. Nach oraler sowie intravenöser Applikation wurden vergleichbare Plasma-Kurven sowohl im Menschen als auch im Tier generiert. Beispielsweise bewirkt die Gabe von 5 bis 8 mg Koffein/kg Körpergewicht

(KG)/d eine Plasma–Koffeinkonzentration von 8 bis 10 mg/L. Folglich unterliegt Koffein keinem entscheidenden First–Pass–Effekt (Arnaud, 1993). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Koffeinkonzentration im Plasma äquivalent zur Konzentration in der Zerebrospinalflüssigkeit ist. Folglich kann der Plasmaspiegel als Surrogatmarker für die ungebundene, freie Fraktion im Gehirn angesehen werden (Liu *et al.*, 2006).

Distribution (D)

Aufgrund seines hydrophoben Charakters ($\log P$ 0,85) passiert Koffein leicht alle biologischen Zellmembranen (Bonati *et al.*, 1982; Bonati *et al.*, 1984), inklusive der Blut–Hirn– (Lachance *et al.*, 1983) und der Plazentaschranke (Ikeda *et al.*, 1982). Während der Liquor–Plasma–Quotient 1,0 in Ratten (Liu *et al.*, 2006) und 0,80 im Menschen (McCall *et al.*, 1982) beträgt, beläuft sich der Milch–Plasma–Quotient im Menschen auf 0,52 (Tyralla und Dodson, 1979). Darüber hinaus weist Koffein eine geringe Plasmaeiweißbindung (10 – 30 %) auf, so dass dessen Einfluss auf Verteilung und Elimination vernachlässigt werden kann. Das scheinbare (apparente) Verteilungsvolumen von Koffein beträgt im Menschen 0,5 bis 0,75 L/kg KG und in Ratten 0,9 L/kg KG und entspricht folglich dem Gesamtkörperwasser (Bonati *et al.*, 1982; Bonati *et al.*, 1984).

Metabolismus (M) und Elimination (E)

Der Metabolismus von Koffein variiert speziesspezifisch. In der Leber wird Koffein zu Mono– und Dimethylxanthinen, Mono– und Dimethylharnsäure, Di– und Trimethylallantoin und Uracilderivaten metabolisiert (Arnaud, 1993; Arnaud, 1987). Speziesbedingt treten im Stoffwechsel von Nagern (40 %) vor allem die trimethylierten Derivate auf. Im Gegensatz dazu sind diese im Menschen mit nur 6 % vertreten. Von besonderem Interesse sind die

pharmakologisch aktiven Metabolite Theophyllin und Paraxanthin. In der Leber wird Paraxanthin durch das Enzym Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2) demethyliert. Im menschlichen Organismus wiederum kann in geringem Ausmaße (6 %) aus Theophyllin Koffein gebildet werden (Tang-Liu und Riegelman, 1981).

Die biologische Plasma-Halbwertszeit variiert in Ratten dosisabhängig. Während bis zu einer Dosis von 5 mg/kg KG die Halbwertszeit 0,7 bis 1,2 Stunden (Bonati *et al.*, 1982; Bortolotti *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 2013; Noh *et al.*, 2015) beträgt, erhöht sich diese ab einer Dosis von 10 mg/kg KG nichtlinear auf 2 bis 4 Stunden (Bortolotti *et al.*, 1990; Wang und Lau, 1998; Liu *et al.*, 2005). Darüber hinaus variiert die Halbwertszeit von Koffein in Ratten altersabhängig. Während die Eliminationshalbwertszeit bei 49 Tage alten Ratten ungefähr einer Stunde beträgt, erhöht sich diese auf 1,5 Stunden bei 105 Tage alten Tieren. Dieser Effekt ist auf die altersabhängige Abnahme der Koffein-Demethylierung in der Leber zurückzuführen (Latini *et al.*, 1980). Die biologische Plasma-Halbwertszeit im Menschen beträgt ca. 2 bis 5 Stunden (Arnaud, 1987), wobei es beim Erwachsenen nachweislich keine altersbedingten Unterschiede gibt (Blanchard und Sawers, 1983). Jedoch verlängert sich die Halbwertszeit bei Neugeborenen auf 100 Stunden, was auf das noch unvollständig ausgereifte CYP-Enzymsystem zurückzuführen ist (Aranda *et al.*, 1979). Darüber hinaus wird die Halbwertszeit von Koffein durch andere CYP1A2-metabolisierenden Substanzen beeinflusst. Beispielsweise wird die Halbwertszeit durch CYP-Induktion beim Rauchen reduziert (Dettmer *et al.*, 2005).

Im Menschen sowie im Tier dominiert die renale Elimination, bei der lediglich 2 % des unveränderten Koffeins ausgeschieden wird (Arnaud, 1976). Die geringe Eliminationsrate des reinen Koffeins ist auf die hohe renal-tubuläre

Rückresorption zurückzuführen, die ca. 98 % beträgt. Neben der renalen Elimination werden in Ratten ca. 8 % (Arnaud, 1993) und im Menschen 2 bis 5 % (Callahan *et al.*, 1982) mit den Fäzes ausgeschieden. Darüber hinaus wird Koffein in die Speichelflüssigkeit und Galle sezerniert (Arnaud und Welsch, 1980).

1.3.2 Pharmakodynamik

Koffein blockiert in unphysiologischen, bereits toxischen Koffeinkonzentrationen (0,1 – 1 mM) die Phosphodiesterase und somit den Abbau von cAMP. In Konzentrationen von 5 bis 15 mM setzt Koffein Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum des Zytoplasmas frei (Nehlig *et al.*, 1992). Diese koffeinbedingten Änderungen des Kalziumspiegels bewirken unter anderem die Kontraktion der glatten sowie Skelettmuskelzellen.

In therapeutischen Konzentrationen, die beim täglichen Kaffee- bzw. Teekonsum anfallen, werden vor allem die Adenosinrezeptoren blockiert (Fredholm *et al.*, 1999). Hierbei antagonisiert Koffein den endogenen Liganden Adenosin bereits ab Konzentrationen von 10 bis 100 µM. Dadurch werden auf molekularer Ebene zahlreiche Transmitter, wie z.B. Serotonin, Dopamin und Noradrenalin verstärkt gebildet (Bickford *et al.*, 1985; Daly *et al.*, 1993). In diesem Zusammenhang wird die neuroprotektive Wirkung des Koffeins diskutiert (vgl. 1.3.4).

Die beliebten, durch die Hemmung von Adenosin ausgelösten Effekte der reduzierten Müdigkeit und der verbesserten Konzentrationsfähigkeit (Nehlig *et al.*, 1992) werden in Kapitel 1.3.3 ausführlicher dargestellt.

1.3.3 Der Einfluss von chronischer Koffeinaufnahme auf das adenosinerge System im Hinblick auf die Schlaf–Wach–Regulation

Die den Schlaf beeinflussenden Effekte von Koffein bzw. Kaffee, die auf die Blockade der Adenosinrezeptoren zurückzuführen sind, zeigen sich im Menschen erst ab einer Mindestdosis von 100 mg Koffein (Dorfman und Jarvik, 1970). Ab dieser Dosis findet ein zeitverzögertes Einschlafen um ca. 33 Minuten statt (Goldstein, 1964). Die EEG-basierten Befunde bestätigten dabei die verminderte Schlafqualität innerhalb von vier Stunden nach dem Koffeinkonsum, was interessanterweise ebenfalls der Metabolisierungszeit von Koffein in der Leber entspricht (Muller-Limmroth, 1972). Entscheidend für die nächtliche Schlaflosigkeit ist jedoch eher die über Tag konsumierte Menge an Koffein als der Zeitpunkt, zu dem der Kaffee vor dem Schlafengehen eingenommen wurde (Karacan *et al.*, 1976).

Während bei Langzeit-Kaffeetrinkern keine signifikanten Veränderungen des Schlafrhythmus zu beobachten sind, erleben sporadisch trinkende Kaffeekonsumenten eine tageszeitunabhängige und längere Latenzzeit bis zum Einschlafen sowie verstärkte Störungen in den verschiedenen Schlafphasen (Colton *et al.*, 1968; Curatolo und Robertson, 1983). Hierbei verlängert Koffein vor allem die Leichtschlafphasen (N2) und verkürzt die Tiefschlafphasen (N3) des NREM-Schlafes. Dabei ist jedoch nicht eindeutig geklärt, ob die fehlenden koffeinbedingten Wirkungen bei den Langzeit-Kaffeetrinkern der Toleranzentwicklung oder vielmehr der interindividuellen Ansprechrate der Patienten gegenüber den Wirkungen von Koffein zuzuschreiben sind (Goldstein *et al.*, 1969; Holtzman *et al.*, 1991).

In Ratten führt die Koffeinapplikation von mindestens 12,5 mg/kg KG zu einer Reduktion der Gesamtschlafdauer sowie der Verlängerung der Latenzzeit (Nehlig *et al.*, 1992). Dem gegenüber steht eine Dosis von 1,25 mg/kg KG, was

ca. einer Tasse Kaffee entspricht. Diese geringen Dosen haben zwar keinen signifikanten Effekt auf die Gesamtschlafdauer, erhöhen jedoch die SWS-Phase auf Kosten des REM-Schlafes (Landolt *et al.*, 1995; Yanik und Radulovacki, 1987). Darüber hinaus konnte in schlafentzogenen Ratten bereits eine signifikante Reduktion der Einschlafversuche beobachtet werden (Schwierin *et al.*, 1996).

Auf molekularer Ebene zeigte die Langzeitapplikation (1 – 6 Wochen) von ca. 0,3 g/L Koffein (entspricht 4 – 5 Tassen) inkonsistente Befunde. In einigen In vitro-Studien konnte proportional zur Dosis eine Aufregulierung des A₁AR beobachtet werden (Chou *et al.*, 1985; Boulenger *et al.*, 1983; Fredholm, 1982). Während eine Dosis von 10 mg/kg KG/d eine 27 %-ige Erhöhung der maximalen Rezeptorbindung (B_{max}) hervorrief, zeigte die Hälfte der Dosis (5 mg/kg KG/d) eine verminderte Aufregulation des A₁AR um lediglich 12 % (Chou *et al.*, 1985). In Dosen, die den täglichen menschlichen Koffeinkonsum deutlich überstiegen (ab 50 mg/kg KG/d, ca. 9 Tassen Kaffee), konnte an Ratten eine regionenspezifische Aufregulierung des A₁AR beobachtet werden (Hawkins *et al.*, 1988; Daval *et al.*, 1989; Ramkumar *et al.*, 1988; Wu und Coffin, 1984). Auf die chronische Koffeinapplikation sprachen vorwiegend der A₁AR des Zerebellums, des Kortex und des Thalamus an. Hingegen konnten im Hippokampus keine signifikanten Veränderungen der A₁AR-Dichte beobachtet werden (Hawkins *et al.*, 1988; Marangos *et al.*, 1984; Wu und Coffin, 1984). Im Gegensatz dazu wurde in weiteren In vitro-Studien sowohl bei niedrigen als auch höheren Dosen keine molekularspezifischen Veränderungen des A₁AR in Folge chronischer Koffeinapplikation gefunden (Espinosa *et al.*, 2013; Johansson *et al.*, 1996; Georgiev *et al.*, 1993; Traversa *et al.*, 1994; Zielke und Zielke, 1987).

Interessanterweise blieben die inkonsistenten Befunde über das Absetzen des Koffeins hinaus bestehen. Die Aufregulation des A₁AR sowie unveränderte A₁AR-Dichten konnten bis einschließlich Tag 2 nach Absetzen des Koffeins detektiert werden (Wu und Coffin, 1984; Boulenger und Marangos, 1989; Kaplan *et al.*, 1993; Holtzman *et al.*, 1991).

Mithilfe von Kompetitionen mit Agonisten und In vitro-Autoradiografie kann der hoch- sowie niedrigaffine Zustand des A₁AR differenziert werden (Ramkumar *et al.*, 1988; Hawkins *et al.*, 1988; Traversa *et al.*, 1994; Green und Stiles, 1986). Hier konnte gezeigt werden, dass im unbehandelten Tier der niedrigaffine Zustand dominiert. Unter chronischer Koffeinapplikation (0,1 g/L) wird eine vollständige Verschiebung des niedrigaffinen zugunsten des hochaffinen Zustandes ausgelöst (Green und Stiles, 1986; Daval *et al.*, 1989). Die damit verbundene erhöhte Kopplung zwischen Rezeptor und G-Protein führt wiederum zur Sensibilisierung des A₁AR gegenüber seinem endogenen Liganden Adenosin (Ramkumar *et al.*, 1988).

Darüber hinaus konnten unter chronischer Koffeinapplikation im Gegensatz zum SD keine Veränderungen der A₁AR-mRNA identifiziert werden (Johansson *et al.*, 1993). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Aufregulierung des A₁AR durch die lokale Inhibition der adenosinergen Effekte und nicht über die transkriptionelle Regulation hervorgerufen wird. Es wird vermutet, dass Koffein der A₁AR-Internalisierung entgegenwirkt und/oder die für die Bindung verantwortliche Modifikation verhindert (Johansson *et al.*, 1993). Die sowohl durch Koffein als auch durch SD ausgelöste Aufregulierung des A₁AR legt nahe, dass Koffein den Effekt anhaltender Wachheit imitiert. Da anhaltende Wachheit stets mit einem erhöhten Adenosinspiegel einhergeht, ist davon auszugehen, dass unter chronischer Koffeingabe die extrazelluläre Adenosinkonzentration ansteigt. Unterstützend konnte gezeigt werden, dass

sich unter chronischer Koffeingabe der Adenosin–Plasmaspiegel um das Zehnfache erhöht (Conlay *et al.*, 1997). Darüber hinaus löst eine akute Gabe von 450 mg Koffein (= 4 bis 5 Tassen Kaffee), was einer 50%igen Blockade der zerebralen A₁AR entspricht (Elmenhorst *et al.*, 2012), die Hydrolyse von ATP und ADP zu Adenosin über die Ektonukleotidasen der Synaptosomen in Hippokampus und Striatum aus. Der dadurch hervorgerufene Anstieg der zellulären Adenosinkonzentration kompensiert wiederum die antagonistische Wirkung von Koffein auf Rezeptorebene (da Silva *et al.*, 2003).

1.3.4 Der Einfluss von chronischer Koffeineinnahme auf das adenosinerge System im Hinblick auf neuroprotektive Effekte

Neben seiner schlafbeeinflussenden Wirkung wird in jüngster Zeit die prophylaktische Wirkung von chronischem Koffeinkonsum gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert. Bei Kaffeetrinkern mit regelmäßigem Koffeinkonsum konnte das Risiko an Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson zu erkranken signifikant reduziert werden (Chuo *et al.*, 2007; Qi und Li, 2014). So führte der langfristige Konsum von 3 bis 5 Tassen Kaffee zu einer Risikoreduktion für Demenz (einschließlich der Alzheimer–Krankheit) um 65 bis 70 % (Eskelinen *et al.*, 2009).

Die für den Morbus Parkinson bekannte Dopaminverarmung durch Degeneration dopaminerger Neuronen in Mittelhirn und Striatum kann mithilfe von Koffein als unselektivem Adenosinantagonisten entgegengewirkt werden und somit die Motorik von an Parkinson erkrankten Patienten teilweise verbessert werden (Kalda *et al.*, 2006). Dieser Wirkmechanismus ist möglicherweise auf die kolokalisierten, aber antagonistisch interagierenden Dopamin– und A_{2A}AR zurückzuführen (Ferre *et al.*, 1991). Während eine Aktivierung der A_{2A}AR gleichzeitig zur Inaktivierung der dopaminergen D₂–Rezeptoren führt, kann die Blockade der A_{2A}AR über Koffein die

lokomotorische Aktivität verbessern (Kalda *et al.*, 2006). Neben der Motorik bei der Parkinson-Erkrankung verbessert Koffein die Gedächtnisleistung bei der Alzheimer-Erkrankung. Morbus Alzheimer ist durch die Anhäufung amyloider Plaque-Fragmente und der damit verbundenen Zerstörung der betroffenen Neuronen gekennzeichnet. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Koffein die Ansammlung von Amyloid- β -Protein enthaltenden Plaques und somit die induzierten kognitiven Beeinträchtigungen verhindert (Cao *et al.*, 2009; Chu *et al.*, 2012; Arendash *et al.*, 2006). Darüber hinaus wirkt Koffein antientzündlich (Lappas *et al.*, 2005) und verhindert die Amyloid- β -Protein-induzierte Synaptotoxizität (Canas *et al.*, 2009a). Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass unter chronischer Koffeinapplikation das Ausmaß der Alzheimer-spezifischen Tau-Phosphorylierung reduziert wird (Laurent *et al.*, 2014).

Der Adenosinrezeptor, der am stärksten an der koffeinbedingten Neuroprotektion im Gehirn beteiligt ist, ist augenscheinlich der A₁AR, da dieser ubiquitär und am häufigsten im Gehirn vorkommt (Fastbom *et al.*, 1987b; Jarvis *et al.*, 1989). Darüber hinaus setzt Adenosin als endogener Neuromodulator über den A₁AR die synaptische Transmission und die neuronale Erregbarkeit herunter (Dunwiddie und Masino, 2001; Phillis und Wu, 1981). Diese Regulation wird durch die verminderte Freisetzung von diversen Neurotransmittern wie Acetylcholin und Glutamat ausgelöst (Fredholm und Dunwiddie, 1988). Postsynaptisch wird auf diese Weise die Aktivität der NMDA-Rezeptoren sowie der damit verbundene Kalziumeinstrom vermindert (Corradetti *et al.*, 1984). Außerdem wird die neuronale Membran durch vermehrten Kaliumeinstrom hyperpolarisiert, sodass letztendlich die Erregungsschwelle für die Auslösung eines Aktionspotentials angehoben wird (Rudolphi *et al.*, 1992a).

Wie bereits in Kapitel 1.2.4 beschrieben, werden über die Adenosin-vermittelte Aktivierung des A₁AR proinflammatorische Zytokine freigesetzt. In pathologischen Zuständen (wie z.B. Traumata und Ischämien) werden diese wiederum vermehrt ausgeschüttet und lösen auf diesem Wege die Zellapoptose aus. Über den Adenosin-vermittelten Antagonismus wirkt Koffein somit neuroprotektiv und der Bildung der schädigenden Substanzen und der damit verbundenen Apoptose entgegen (Tsutsui *et al.*, 2004; Salvemini *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2012). Die umstrittene Rolle des Adenosins als endogenes Neuroprotektivum konnte durch die Gabe selektiver A₁AR-Agonisten während Ischämien bestätigt werden (Rudolphi *et al.*, 1992b). Außerdem verschärfte die akute Gabe von Koffein als unselektivem A₁AR-Antagonisten die ischämischen neuronalen Schäden signifikant (Sutherland *et al.*, 1991; de Mendonca *et al.*, 2000). Interessanterweise führte jedoch die chronische Applikation von Koffein, die durch eine A₁AR-Aufregulation gekennzeichnet ist (Jacobson *et al.*, 1996), zur Verminderung der neuronalen Ischämien (Effektinversion) (vgl. 1.3.3). Die koffeinbedingte Aufregulierung des A₁AR wird daher als Basis für die positiven neuroprotektiven Effekte diskutiert (Rudolphi *et al.*, 1989). Unterstützend zeigte sich in zahlreichen Studien, dass der A₁AR in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Erkrankung infolge erhöhter Adenosinspiegel herunterreguliert bzw. desensibilisiert wurde (Kalaria *et al.*, 1990; Ulas *et al.*, 1993). Infolgedessen würde Koffein durch die potentiell neuroprotektive Aufregulierung die Alzheimerbedingte Abnahme des A₁AR ausgleichen. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang jedoch festgestellt werden, dass die Abnahme der Rezeptordichte Alzheimer-unspezifisch (Deckert *et al.*, 1998) und womöglich auf Alterungsprozesse zurückzuführen ist (Meerlo *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 2007). Darüber hinaus zeigen neuere Befunde, dass in der Alzheimer-Pathologie der A₁AR im frontalen Kortex und Hippokampus nicht nur aufreguliert, sondern auch

sensibilisiert wird (Albasanz *et al.*, 2008; Angulo *et al.*, 2003). Gleichwohl bleibt die adenosinbedingte neuroprotektive Rolle des Koffeins weiterhin unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

1.4 Ziel der Arbeit

Koffein ist ein weltweit verbreitetes Neurostimulans, dessen ZNS-Wirkungen primär über eine Antagonisierung der Rezeptoren des Neuromodulators Adenosin vermittelt werden. Es verändert Aufmerksamkeit und Konzentration und beeinflusst das Schlaf-Wachverhalten. Bei chronischer Einnahme sind dauerhafte Veränderungen des Schlafverhaltens und auch Hinweise auf protektive Effekte gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet worden. Die Adenosinrezeptoren stellen daher eine wichtige Zielstruktur für pharmakologische Entwicklungen im Bereich der Schlafstörungen und ggf. der neurodegenerativen Erkrankungen dar. Dafür ist jedoch ein genaues Verständnis der molekularen Mechanismen erforderlich, die den chronischen Koffeinwirkungen zugrunde liegen. Das Ziel der vorliegenden Dissertation besteht daher in der Untersuchung des Einflusses einer chronischen Koffeineinnahme auf das adenosinerge System im Hinblick auf die Schlaf-Wach-Regulation sowie auf potentiell neuroprotektive Effekte. Die in diesem Zusammenhang publizierten Studien zu koffeinbedingten Veränderungen der A₁AR-Dichte (vgl. 1.3.3) entstammen ausschließlich In vitro-Studien und weisen inkonsistente Befunde auf. Das erste Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, die langfristigen Effekte auf die A₁AR-Expression nach chronischer Koffeingabe in vivo mittels der Positronen-Emissionstomografie (PET) zu untersuchen. Anders als bei In vitro-Ansätzen werden in vivo auch komplexe, den ganzen Organismus einbeziehende kompensatorische Effekte sichtbar.

Zum zweiten sollten die molekularen Veränderungen des chronischen Koffeinkonsums im Hinblick auf dessen Einfluss auf das Schlafverhalten

untersucht werden. Bisher ist die extrazelluläre Adenosinkonzentration ausschließlich in Bezug auf den Schlaf–Wach–Rhythmus und den SD untersucht worden. Die Ergebnisse deuten auf einen zirkadianen Konzentrationsverlauf in den schlafrelevanten Hirnarealen des BF und des FC hin (Kalinchuk et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob ein ähnliches Zeitprofil in anderen schlafrelevanten Hirnregionen, wie bspw. im Thalamus, das sog. „Tor zum Bewusstsein“ (McCormick und Bal, 1997), beobachtet werden kann. Darüber hinaus ist der Einfluss von Koffein als unselektiver Adenosinantagonist auf die zerebrale, extrazelluläre Adenosinkonzentration bislang nur unvollständig charakterisiert worden. Daher werden in dieser Arbeit, neben der Untersuchung des zirkadianen Verlaufes von Adenosin in den schlafrelevanten Hirnregionen des Kortex und des Thalamus, auch die koffeinbedingten interstitiellen Veränderungen mittels Mikrodialyse untersucht.

In jüngster Zeit ergibt sich aus epidemiologischen Studien vermehrt Evidenz dafür, dass die Langzeiteinnahme von Koffein einen neuroprotektiven Effekt gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere der Alzheimer- und Parkinsonerkrankung, haben könnte (Eskelinen *et al.*, 2009; Rosso *et al.*, 2008). Der zugrunde liegende molekulare Wirkmechanismus ist bislang jedoch nicht aufgeklärt worden. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnisse werden daher auch im Hinblick auf die Frage untersucht, welche der hier betrachteten molekularen Zielstrukturen und –mechanismen bei möglichen neuroprotektiven Wirkungen des Koffeins involviert sein und Gegenstand entsprechender Folgestudien werden könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) des Landes NRW nach dem deutschen Tierschutzgesetz genehmigt und durchgeführt. Hierbei wurden adulte, männliche Sprague–Dawley–Ratten (Charles River Laboratories, Erkrath) mit einem Gewicht von 434 ± 36 g zu Beginn der Studie verwendet. Diese wurden zu je 2 Tieren pro Käfig in einem 12/12 h Hell–/–Dunkelzyklus (Lichtphase: 7.00 bis 19.00 Uhr) bei 22 ± 1 °C gehalten und mit Standard–Laborfutter sowie Trinkwasser *ad libitum* versorgt. Bei der PET–Studie wurden 16 Tiere und bei der Mikrodialyse–Untersuchung 14 Tiere eingesetzt.

2.2 Chronische Koffeinapplikation

Die chronische Koffeinapplikation erfolgte *per os* über koffeiniertes Trinkwasser (0,4 g/l) über einen Zeitraum von 12 Wochen (Alhaider *et al.*, 2010).

Um die Daten in direkten Bezug zu einer potenziell neuroprotektiven Wirkung des Koffeins setzen zu können, wurde die chronische Koffeingabe an einen humanen Kaffeekonsum von 4 bis 5 Tassen Kaffee pro Tag angepasst. Das entspricht einer mittleren Koffeinaufnahme von 400 bis 500 mg einer 70 kg–schweren Person ($=7,14$ mg/kg KG) (Fredholm *et al.*, 1999). Aufgrund der schnelleren Metabolisierung des Koffeins bei Ratten im Vergleich zum Menschen wird die Dosis zusätzlich um den Faktor von 3,6 erhöht (Shukitt-Hale *et al.*, 2013). Somit ergibt sich eine auf Ratten normierte Koffeindosis von 30 mg/kg KG/d.

In dieser Studie betrug die tatsächliche täglich eingenommene Menge an Koffein pro Ratte $16,27 \pm 1,03 \text{ mg/d}$ (entspricht $29,49 \pm 1,73 \text{ mg/kg KG/d}$) (vgl. Tabelle 3.1). Die zu applizierende Koffeindosis wurde wöchentlich auf Basis der gemittelten Körpergewichte pro Käfig (d.h. zu je 2 Tieren) und der dazugehörigen Trinkmenge bestimmt. Die von den Tieren konsumierte Trinkmenge wurde aus der Differenz der vorausgegangenen bzw. frisch angesetzten Trinkflasche und des gegenwärtigen Trinkflaschengewichtes berechnet und der Wert durch die Anzahl der Tiere pro Käfig und der Wochentage dividiert (s. Formel 2.1).

Formel 2.1:

$$\begin{aligned} & \text{Durchschnittliche Trinkmenge/ Tier/d [g]} \\ &= \frac{\text{Trinkflaschengewicht (vorher)} - \text{Trinkflaschengewicht (nachher)}}{\text{Anzahl Tiere pro Käfig} + \text{Applikationszeitraum in Tage}} \end{aligned}$$

Anschließend wurde wie folgt die Soll–Einwaage pro Käfig pro Flascheninhalt ermittelt (vgl. Formel 2.2):

Formel 2.2:

$$\begin{aligned} & \text{Solleinwaage Koffein in mg pro mL Trinkflascheninhalt} \\ &= \frac{\text{gemittelte KG/ Käfig [kg]} * 30 \text{ mg/kg KG/ d}}{\text{durchschnittliche Trinkmenge/ Tier/d [g]}} \end{aligned}$$

Abschließend wurde die eingewogene Koffeinmenge in dem gewünschten Gesamt–Trinkwasservolumen (*hier*: 400 mL Trinkflascheninhalt) gelöst.

Aus Tierschutzgründen (GV-SOLAS, 2004) wurde bewusst auf Einzelhaltung verzichtet und eine Gruppengröße von 2 Tieren pro Käfig gewählt. Aus diesem Grund konnte die individuell aufgenommene Dosis ausschließlich aus den gemittelten Werten pro Käfig ermittelt werden. Diese Problematik hätte mit einer individuell injizierten Dosis (*intraperitoneal* oder *subkutan*) umgangen werden können, hätte jedoch die Übertragbarkeit zum Menschen, der

bekanntermaßen Koffein *per os* aufnimmt, vermindert. Einer potentiell ungleichmäßig aufgenommenen Menge an Koffein innerhalb eines Käfigs sprechen publizierte Befunde entgegen, die zeigen, dass die Tiere in Gruppenhaltung bezüglich ihrer täglichen Wasseraufnahme keine signifikanten Unterschiede zeigen (Pettenuzzo *et al.*, 2008; Alhaider *et al.*, 2010). Die tägliche Trinkmenge eines Tieres betrug, ausgehend von einer Dichte des koffeinierten Wassers von ca. 1g/L, $42,60 \pm 3,90$ mL und lag damit im Normbereich von 39 bis 61 mL/Tier/d (Osborn *et al.*, 1962).

2.3 Narkose

Die PET–Untersuchungen sowie die Implantation der Führungskanülen erfolgten unter Isofluran–Inhalationsnarkose. Hierzu wurde das Tier in eine abgedunkelte Box gesetzt und die Narkose mit 5 % Isofluran in 2 L O₂/min eingeleitet (dediziertes Kleintiernarkosegerät mit Isofluranverdampfer). Die hohe initiale Dosis diente der schnellen Überwindung des unerwünschten Exzitationsstadiums, das durch unwillkürliche Muskelzuckungen gekennzeichnet ist. Bei Erreichen des Toleranzstadiums wurde zur Aufrechterhaltung 1,5 bis 2 % Isofluran in 2 L O₂/min verwendet. Zur Überwachung der Vitalparameter der Tiere während der gesamten Narkose wurde engmaschig die Atemfrequenz (mithilfe von Pulsoxymetrie) und die Körpertemperatur kontrolliert. Um die Körpertemperatur der narkotisierten Tiere konstant halten zu können, standen Wärmeeinrichtungen (z. B. Wärmelampe, Wärmeplatte, Wärmekissen) zur Verfügung.

2.4 In vivo–Quantifizierung der zerebralen A₁AR mittels PET

Mithilfe der PET wurde die zeitliche Änderung der A₁AR–Expression nach Beendigung der chronischen Koffeinapplikation untersucht.

2.4.1 Prinzip der PET

Die PET ist ein nicht–invasives, bildgebendes Verfahren der Nuklearmedizin und dient der Darstellung von metabolischen Vorgängen im Organismus durch die spezifische Verteilung sowie Anreicherung eines Radiotracers (Kauffmann *et al.*, 2006). Als Radiotracer dient ein mit einem kurzlebigen Radioisotop markiertes Molekül, welches gemäß dem Tracer–Prinzip die physiologische Verteilung sowie Metabolisierung der Ursprungssubstanz aufgrund seiner ähnlichen physikochemischen Eigenschaften nicht signifikant verändert. Für die Bildgebung werden dabei hauptsächlich Radiotracer verwendet, die spezifisch an die zu untersuchenden Rezeptoren binden und sich somit vor allem in rezeptorreichen als auch in rezeptorarmen Regionen anreichern. Im zeitlichen Verlauf zerfällt das Radioisotop entsprechend seiner Halbwertszeit und emittiert im Organismus Positronen, den sog. Beta–Plus–Zerfall (β^+) (Dössel und Buzug, 2014). Die Positronen, die das Antiteilchen des Elektrons darstellen, treffen im Gewebe auf ein Elektron und werden dabei unter Aussendung von zwei Gamma–(γ)–Quanten, die mit einer Energie von jeweils 511 keV und einem Winkel von 180 ° auseinander fliegen, vernichtet (Annihilation). Durch den ringförmig angeordneten Detektor können anschließend die beiden zeitgleich emittierten Photonen gemessen werden. Aufgrund ihrer zeitlichen und geometrischen Beziehung zueinander (Koinzidenz) kann mithilfe einer rechnerischen Verbindungslinie (*Line of response*, LOR) der Ursprung des Annihilationspunkts ermittelt werden (s. Abb. 2.1).

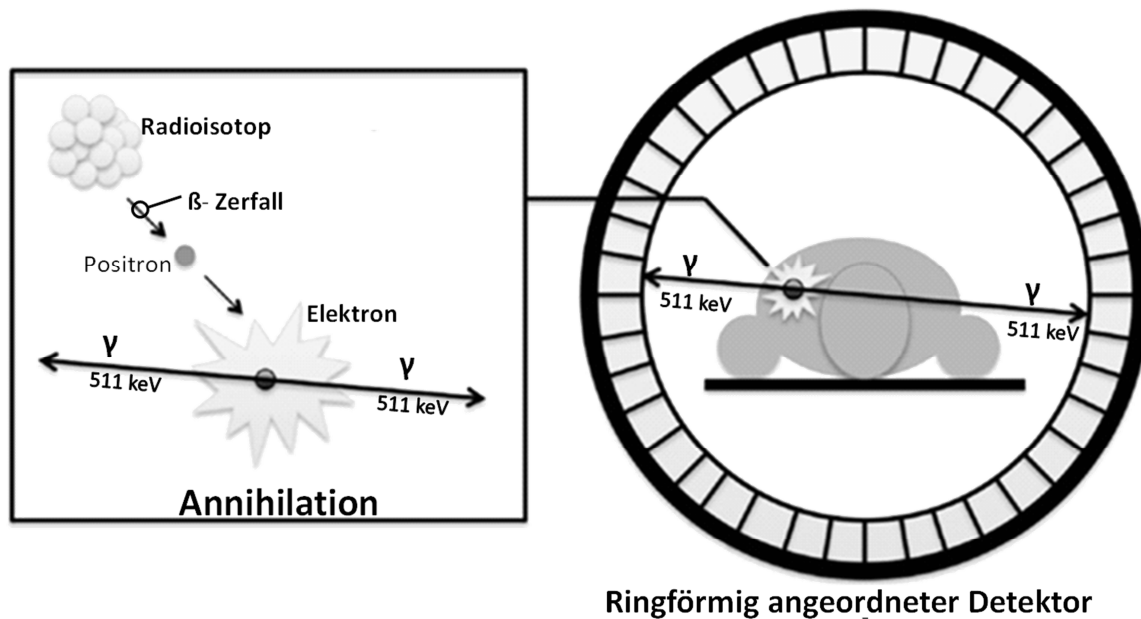


Abb. 2.1: Positronenemission und nachfolgende Annihilierung unter Aussendung von zwei Gammaquanten im PET-Scanner nach van der Veldt *et al.* (2013).

Mithilfe mathematischer Rekonstruktionsverfahren kann aus der Vielzahl der Verbindungslinien die räumliche Verteilung des Radioisotops im Organismus und somit die damit verbundenen physiologischen Prozesse dargestellt werden. Jedoch kann die registrierte Koinzidenzstrahlung durch Mechanismen wie Absorption und Streuung verfälscht werden. Ziel der PET ist es Koinzidenzen, die ohne signifikante Wechselwirkungen bzw. durch ein einziges Annihilationsereignis entstanden sind, zu detektieren (Mohnike und Hör, 2007). Diese Ereignisse werden als wahre Koinzidenzen bezeichnet. Zu den unerwünschten Wechselwirkungen des 511-keV Photons mit dem Untersuchungsvolumen zählt der Photo- und Compton-Effekt. Beim Photoeffekt gibt das Photon seine gesamte Energie an ein Hüllenelektron eines Atoms der inneren Schale ab und wird somit vollständig absorbiert (Dössel und Buzug, 2014). Im Gegensatz dazu charakterisiert der Compton-Effekt die Streuung des Photons an einem Elektron. Dabei überträgt das Photon seine Energie partiell auf das Elektron und verändert weiterhin seine Ausbreitungsrichtung, was zu einer Abschwächung des Signals und damit zu

einer Verfälschung der wahren Tracerverteilung kommt. Folglich ist eine Absorptionskorrektur der Emissionsdaten notwendig. Diese erfolgt durch die sogenannte Transmissionsmessung, bei der Photonen durch eine rotierende, im PET integrierte und radioaktive Quelle emittiert werden. Das daraus resultierende Bild wird anschließend zur Datenkorrektur herangezogen (für weitere Informationen, s. Dössel und Buzug (2014)).

2.4.2 Studiendesign

Die Sprague–Dawley–Ratten wurden nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase einer ersten PET–Messung (Baseline–Messung, BL) unterzogen, um den Ausgangswert der zerebralen Rezeptordichte zu bestimmen. Anschließend erfolgte eine 12–wöchige Koffeinapplikation über das Trinkwasser (vgl. 2.2). Nach Abschluss dieser Applikationsphase wurde das Koffein methodisch bedingt abgesetzt, da andernfalls die A₁AR–Dichte aufgrund der Kompetition des Koffeins mit dem hier verwendeten Radiotracer [¹⁸F]CPFPX nicht zu quantifizieren wäre. Nach $4,42 \pm 0,22$ Stunden des Absetzens wurde eine zweite PET–Messung durchgeführt. Weitere PET–Scans schlossen sich an Tag 2 (nach $27,79 \pm 0,42$ Stunden), Tag 4 ($75,79 \pm 0,47$ Stunden) und Tag 7 ($172,01 \pm 0,35$ Stunden) zu jeweils gleichen Tageszeiten an (vgl. Abb. 2.2). Die Kontrollgruppe, die normales Trinkwasser erhielt, wurde analog behandelt und nach dem gleichen Zeitplan untersucht. Nach Abschluss der letzten PET–Untersuchung wurden die Tiere, ohne erneut aus der Narkose zu erwachen, durch Dekapitation getötet.

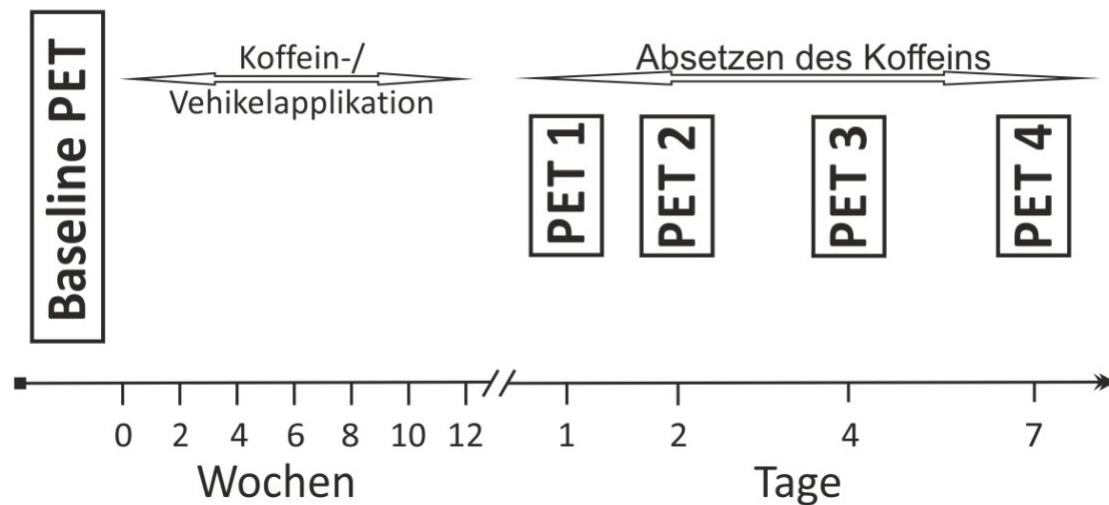


Abb. 2.2: experimentelles Studiendesign zur PET-Untersuchung.

2.4.3 Allgemeine Durchführung

Die PET-Messungen erfolgten an einem Siemens Inveon Multimodality PET-Scanner (Siemens, KNO_xville, TN, USA) unter Isoflurannarkose (vgl. 2.3) analog zum Kroll *et al.* (2014) beschriebenen Verfahren. Es wurden jeweils zwei Tiere parallel untersucht, die Tiere wurden dabei so „Kopf an Kopf“ positioniert, dass sich die Hirne beider Tiere annähernd mittig im *Field of View* (FOV) des Scanners befanden. Zur Ermittlung der regionalen, gewebespezifischen Schwächungsfaktoren wurde vor der Emissionsmessung eine 15-minütige Transmissionsmessung mit einer externen ⁵⁷Cobalt-Quelle durchgeführt.

Anschließend wurde der Radioligand (s. 2.4.4) als Bolus mit 1 mL pro Minute (Harvard Apparatus, Holliston, USA) in eine Schwanzvene injiziert ($19,83 \pm 2,17$ MBq in 1 mL Kochsalzlösung). Direkt im Anschluss wurde für beide Tiere eine insgesamt 70-minütige Emissionsmessung durchgeführt. Dabei betrug die gruppen- und scanunabhängige, injizierte Stoffmenge des Radioliganden $0,388 \pm 0,241$ nmol (vgl. Kapitel 3.2).

Zur Quantifizierung der A₁AR-Expression mittels PET wurde als Radiotracer der am Forschungszentrum Jülich entwickelte und etablierte Radioligand

[¹⁸F]CPFPX (Bauer *et al.*, 2003a; Bauer *et al.*, 2003b; Bier *et al.*, 2006; Elmenhorst *et al.*, 2013; Holschbach *et al.*, 2002; Kroll *et al.*, 2014; Matusch *et al.*, 2006; Meyer *et al.*, 2006) (vgl. 2.4.4) mit einer Halbwertszeit von 109,6 Minuten verwendet.

2.4.4 Radiotracer [¹⁸F]CPFPX

[Fluor-18] 8-cyclopentyl-3-(3-fluoropropyl)-1-propylxanthin ([¹⁸F]CPFPX) bindet als A₁AR-Antagonist hochaffin (im subnanomolaren Bereich) und selektiv (>700-fach) an die Rezeptoren im Gehirn von Mäusen (Holschbach *et al.*, 2002), Ratten (Elmenhorst *et al.*, 2013) und Menschen (Bauer *et al.*, 2003b; Meyer *et al.*, 2006) an. Dabei konnte an Ratten die Test-Retest-Reproduzierbarkeit nachgewiesen werden (Kroll *et al.*, 2014). [¹⁸F]CPFPX wird routinemäßig am Forschungszentrum Jülich nach Holschbach *et al.* (2002) hergestellt und zuverlässig innerhalb von 55 Minuten mit einer radiochemischen Reinheit von ca. 98% synthetisiert. Aufgrund seiner Lipophilie (mit dem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten, log P von ca. 2,1) überwindet [¹⁸F]CPFPX die Blut-Hirnschranke innerhalb weniger Minuten. Des Weiteren zerfällt [¹⁸F]CPFPX ausschließlich in polare Metabolite, die die Blut-Hirnschranke nicht passieren können. Folglich muss zur Quantifizierung des A₁AR über die [¹⁸F]CPFPX-Bindung keine hirneigenen Metabolite berücksichtigt werden (Matusch *et al.*, 2006; Bier *et al.*, 2006; Holschbach *et al.*, 2002).

2.4.5 Daten- und Bildauswertung

Die im Detektor registrierten Koinzidenzen wurden in den Zeitabschnitten 12 x 10 sec, 3 x 20 sec, 3 x 30 sec, 3 x 60 sec, 3 x 150 sec und 11 x 300 sec separat aufsummiert. Diese sog. dynamischen PET-Datensätze wurden daraufhin analytisch durch gefilterte Rückprojektion nach dem zweidimensionalen *Filtered Back Projection* Verfahren einschließlich

Schwächungskorrektur rekonstruiert. Dabei betrugen die Voxelmaße der rekonstruierten Bilder $0,7764 \times 0,7764 \times 0,796 \text{ mm}^3$ mit 128 Pixeln.

Zur Bildauswertung wurden die individuellen PET-Aufnahmen zunächst manuell auf einen speziesspezifischen, elektronischen Rattenhirnatlas von Schiffer *et al.* (2006) (PMOD, Version 3.408, PMOD Group, Zürich, Schweiz) übertragen. Im Allgemeinen wurden die integrierten dynamischen PET-Datensätze, analog zu Kroll *et al.* (2014), auf eine exakte Überlagerung sowie auf visuelle Zeichen möglicher Kopfbewegungen während der Messungen überprüft. Um manuelle Fehler zu minimieren, wurde der BL Scan automatisiert an ein internes Template angepasst. Dieses Template basiert auf 13 [^{18}F]CPFPX-PET-Datensätzen von Tieren der gleichen Spezies und entsprechenden Gewichts- und Gehirnstrukturen. Weiterhin wurden die verbliebenen vier Datensätze eines einzelnen Tieres anhand des jeweiligen, automatisierten BL Scans korrigiert. Zur anschließenden Generierung der Zeit-Aktivitätskurven (TACs = *time activity curves*) wurde ein modifiziertes, in PMOD implementiertes *Volume-of-Interest*-Template von Schiffer *et al.* (2006) auf die normalisierten Einzeldatensätze gelegt. Die Modifikation des Templates erfolgte nachträglich und beinhaltete die Zusammenfassung beider Hemisphären und die Zusammenfassung der kortikalen Areale unter Auslassung des entorhinalen Kortex, sowie das Hinzufügen des *Bulbus olfactorius* als Referenzregion. In Abb. 2.3 wurde beispielhaft die Überlagerung des *Volume-of-Interest*-Templates aufgezeigt. Jedoch wurde an dieser Stelle zur besseren Visualisierung die gemittelten und nicht die Einzeldatensätze verwendet.

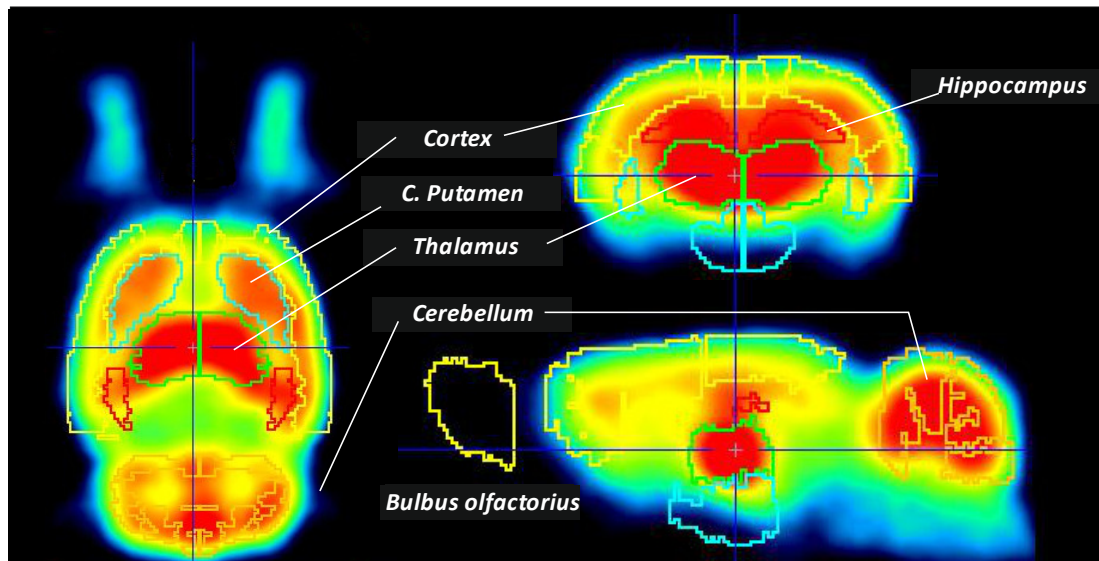


Abb. 2.3: Darstellung der Überlagerung des *Volume-of-Interest*-Templates mit den gemittelten BL Scans ($n = 16$; links: *horizontal*, rechts oben: *koronal*, rechts unten: *sagittal*).

Die gruppenunabhängige, durchschnittliche TAC des Baselinescans für Thalamus als bindungsreiche Region, Kortex mit mittlerer und Hypothalamus mit geringer [^{18}F]CPFPX-Bindung ist in Abb. 2.4 für alle 16 Tiere dargestellt.

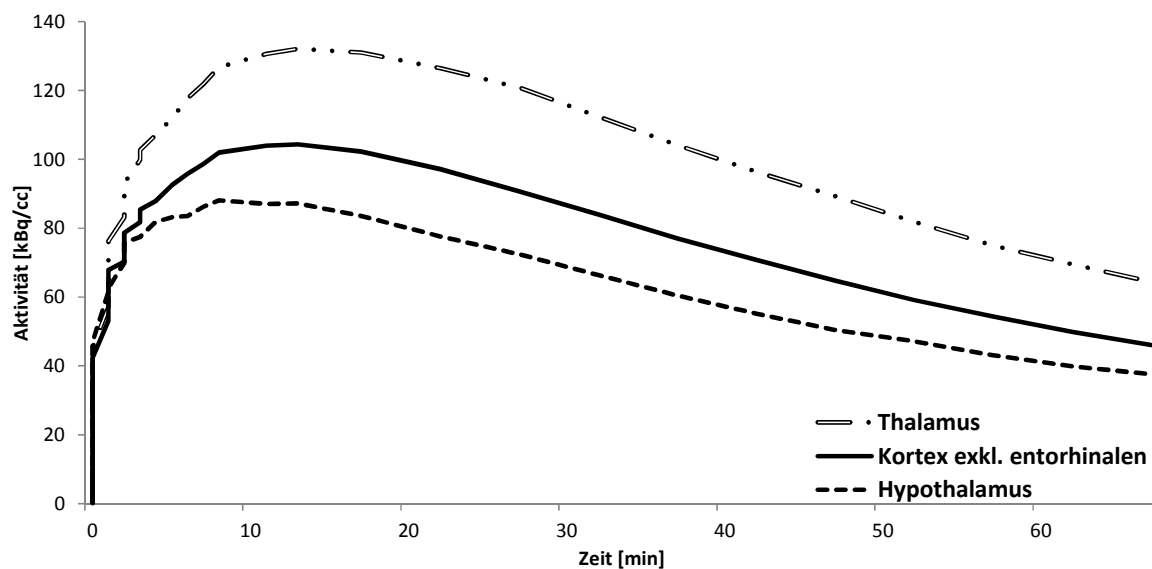


Abb. 2.4: Durchschnittliche TAC des Baselinescans für Thalamus, Kortex exklusive des entorhinalen Teils sowie Hypothalamus ($n = 16$).

Insgesamt wurden die TACs für folgende Regionen mit entsprechendem, durchschnittlichen Gesamtvolumen ausgelesen: Kortex mit 0,51 mL, Zingulum mit 0,03 mL, Caudatus Putamen mit 0,09 mL, Nucleus accumbens mit 0,02 mL, Thalamus mit 0,06 mL, Hypothalamus mit 0,04 mL, Hippokampus mit 0,07 mL, Zerebellum mit 0,15 mL und Riechkolben (*Bulbus olfactorius*) mit 0,05 mL.

Zur anschließenden Quantifizierung, mit dem Bindungspotential als Zielvariable, wurde das auf einer Referenzregion basierende, nicht-invasive, kinetische Modell SRTM („*Simplified Reference Tissue Model*“) verwendet (Lammertsma und Hume, 1996; Elmenhorst *et al.*, 2013). Dabei spiegelt das Bindungspotential, welches sich auf die nichtverdrängbare (*non-displaceable*) Ligandenbindung bezieht (BP_{ND}), eine Funktion aus maximaler Rezeptorbindung (B_{max}) und Ligandaffinität zum Rezeptor ($1/K_D$) wider (Innis *et al.*, 2007). Im Allgemeinen stellt BP_{ND} das Verhältnis des spezifisch gebundenen Radioliganden im Gleichgewichtszustand zu einer Referenzregion ohne oder mit vernachlässigbarer spezifischer Bindung dar. Für die Evaluierung und Berechnung des [^{18}F]CPFPX-Bindungspotentials konnte gezeigt werden, dass das in dieser Arbeit verwendete SRTM mit dem *Bulbus olfactorius* als Referenzregion die stabilsten Parameter ergibt (Kroll *et al.*, 2014).

Viele andere Modellierungsmethoden erfordern zur Darstellung der Tracer-Inputfunktion eine simultane und fortlaufende Entnahme von arteriellen Blutproben während der PET-Akquisition. Analog zum 2-Kompartimente-Modell (s. Abb. 2.5) verteilt sich [^{18}F]CPFPX nach der Bolusapplikation homogen im zentralen Kompartiment, dem Blutplasma. Während dort auch Metabolisierung und Elimination stattfinden, gelangt die ungebundene Muttersubstanz über die Bluthirnschranke in das zweite Kompartiment, das Gehirn. Dort kann sie unspezifisch sowie spezifisch gebunden vorliegen. Zur Quantifizierung der A_1AR -Dichte über das [^{18}F]CPFPX-Bindungspotential wird am A_1AR der spezifisch gebundene Anteil bestimmt.

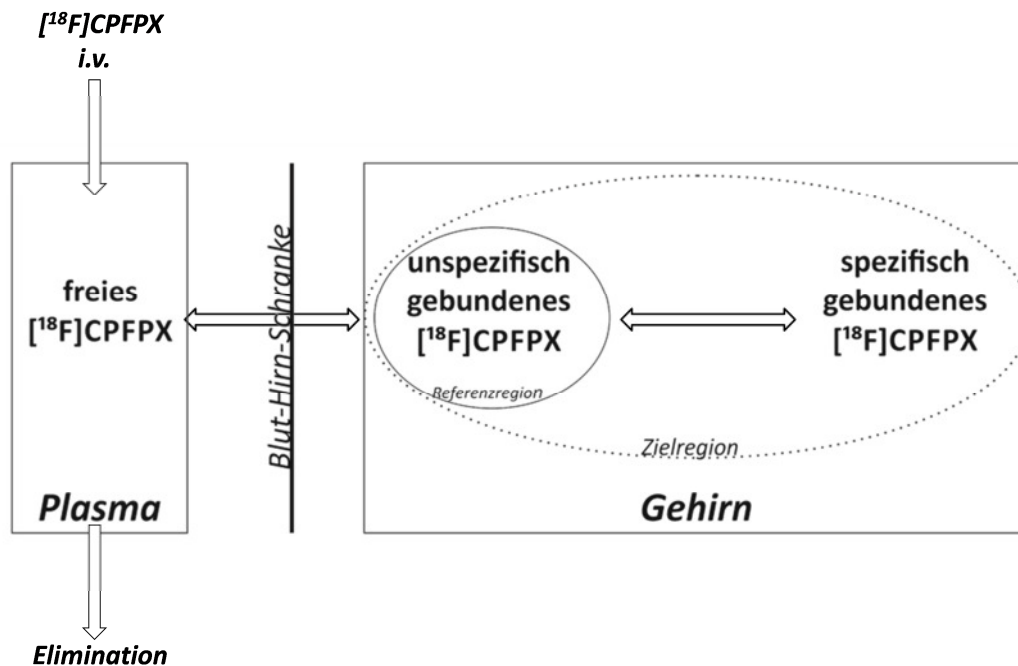


Abb. 2.5: Darstellung des 2-Kompartimente-Modells für $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$.

Bei der referenzbasierten kinetischen Modellierung von $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ ersetzt die Referenzregion das zentrale Kompartiment. Voraussetzung dafür ist, dass die Referenzregion kein bzw. nur wenig spezifisch gebundenes $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ aufweist. Durch Normierung der untersuchten Regionen auf die Referenzregion wird – unter der Annahme einer Gleichverteilung der nicht-spezifischen Bindung – für deren Beitrag zum PET-Signal korrigiert, sodass das spezifisch am A_1AR gebundene $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ quantifiziert werden kann (vgl. Abb. 2.5).

Die in dieser Studie gewählte Referenzregion (*Bulbus olfactorius*) ist nicht frei von spezifischer Bindung, jedoch ist deren Anteil so gering, dass das gewählte Modell gleichwohl angewendet werden kann. In Elmenhorst *et al.* (2013) konnte gezeigt werden, dass die nicht-invasiv bestimmte Zielgröße (BP_{ND}) gut mit invasiv, also über Blutproben, bestimmten Parametern korreliert.

2.5 In vivo–Quantifizierung von extrazellulärem Adenosin mittels Mikrodialyse

Zur Etablierung des experimentellen Aufbaus der Mikrodialyse wurden zahlreiche Vorexperimente und technische Untersuchungen durchgeführt, die der Standardisierung dieses hochsensitiven Verfahrens dienten. Nach vollständiger Etablierung wurden die zirkadianen Konzentrationsänderungen des extrazellulären Adenosins in verschiedenen, für den Schlaf relevanten Hirnregionen des Kortex und des Thalamus im wachen Tier bestimmt. Nach Abschluss der 12-wöchigen Applikationsphase (Koffein vs. Vehikel) wurden schließlich die koffeinbedingten Veränderungen in der extrazellulären Adenosinkonzentration auf den Schlaf–Wach–Rhythmus analysiert.

2.5.1 Prinzip der Mikrodialyse

Mittels der In vivo–Mikrodialyse können niedermolekulare Stoffe, wie z.B. endogene Metabolite oder Neurotransmitter, in der Gewebsflüssigkeit untersucht werden (Ungerstedt, 1986). Die kontinuierliche Gewinnung des Dialysats über einen längeren Zeitraum ermöglicht es, nicht nur die akuten, sondern auch die chronischen Änderungen diverser Stoffwechselprodukte in demselben Tier zu detektieren.

Vorraussetzung für die intrazerebrale Mikrodialyse ist die operative Implantation der Führungskanülen in das Zielgewebe bzw. die Hirnregion (s. 2.5.5). Um ein vorzeitiges Verstopfen des gebildeten Kanals zu verhindern, wird eine abgestumpfte Kanüle (*Dummy*) in die Führungskanüle eingesetzt. Nach einer einwöchigen Regenerationszeit werden die *Dummys* entfernt und an ihrer Stelle eine Mikrodialysesonde durch die Führungskanüle eingeführt.

Kernstück der Mikrodialysesonde ist eine semipermeable Membran, die durch passive Diffusion den Austausch kleiner Moleküle zwischen physiologischer und

künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (Ringerlösung) ermöglicht. Die über die zuführenden Schläuche (*Inlet*) und mit konstantem Fluss (hier: 1,5 µl/min) angespülte Ringerlösung ist analytfrei. Folglich stellt sich entlang des initialen Konzentrationsgradienten ein Konzentrationsgleichgewicht ein, welches dem anschließend gewonnenen Dialysat der intrazellulären Analytkonzentration entspricht. Die Porengröße der Membran kann dabei so gewählt werden, dass Moleküle bis zu einer bestimmten molekularen Masse (Cut-off) die Membran passieren können. Analytbeeinflussende bzw. -abbauende Proteine können auf diese Weise ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wird der Reinheitsgrad des Dialysats und auf diese Weise die Sensitivität der anschließenden Analyse erhöht. Das Dialysat wird aus dem ableitenden Schlauch (*Outlet*) zu festgelegten Zeiten (*hier*: alle zwei Stunden) gewonnen und anschließend mit adäquaten Methoden, wie z.B. der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert.

2.5.2 Studiendesign

Analog zur PET-Studie erfolgte nach der Anlieferung der Versuchstiere eine einwöchige Eingewöhnungsphase. Anschließend wurde bis zum Versuchsende (12 Wochen) Koffein über das Trinkwasser appliziert (s. 2.2 und Abb. 2.6). In der 11. Woche wurden die Mikrodialysesonden unter Allgemeinanästhesie operativ implantiert (vgl. 2.5.5). Mindestens drei Tage vor Versuchsbeginn, der nach Abschluss der insgesamt einwöchigen Wundheilung stattfand, wurden die beiden Tiere zur Gewöhnung vereinzelt in die Versuchsvorrichtung (Mikrodialysebox, s. Abb. 2.13) gesetzt. In dieser Versuchsvorrichtung wurde dann ab Tag 84 die kontinuierliche Dialysatgewinnung über 33 Stunden durchgeführt. Hierbei wurden nach einer 7-stündigen Kalibrierphase in einem Sammelintervall von zwei Stunden Proben gewonnen.

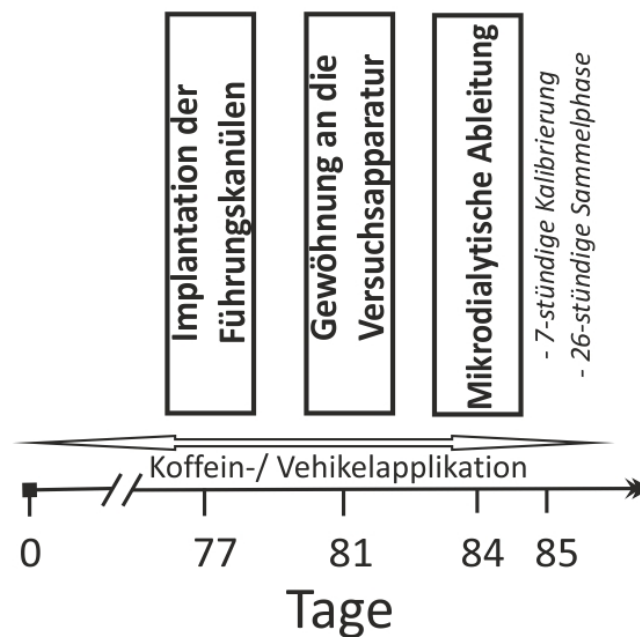


Abb. 2.6: experimentelles Studiendesign zur mikrodialytischen Untersuchung.

2.5.3 Dialysematerial

In der Etablierungsphase wurden kommerziell erworbene Sonden getestet. Dabei zeigte sich, dass die Dialysier-Schlauchsysteme, die eigenständig über eine Steckverbindung an die Sonden anzubringen waren, bei den Messungen vom Tier gelöst werden konnten. Folglich wurden aufgrund dieser instabilen Verbindung im Experiment ausschließlich selbst hergestellte Sonden verwendet (vgl. Abb. 2.7). Diese wurden mit geringfügigen Modifikationen nach der Methode von Boix *et al.* (1994) angefertigt. Dabei lässt sich die Herstellung der Sonden in drei Schritte unterteilen:

- I. *Herstellung des Schlauchsystems*
- II. *Herstellung des Membransystems*
- III. *Zusammenführung beider Systeme*

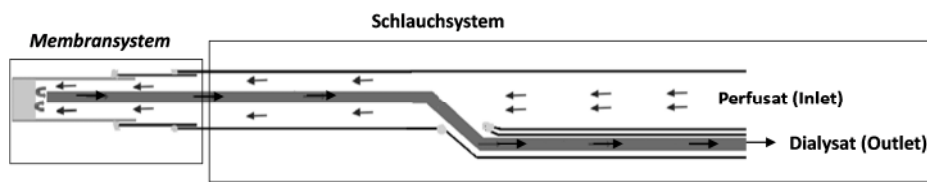


Abb. 2.7: Schematische Darstellung der selbst hergestellten Sonden.

I. Herstellung des Schlauchsystems

Zur Herstellung des Schlauchsystems wurde zunächst das *Inlet* (\varnothing 0,15 cm; Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden) auf die gewünschte Länge von 1,3 m und die *Silica*-Kapillare (fused Silica, \varnothing 75 μ m / 150 μ m, Optronis GmbH, Kehl) auf 1,35 m zugeschnitten. Die *Silica*-Kapillare wurde mittels einer Kanüle (Sterican, 23G, B. Braun, Melsungen) in den großen *Inlet*-Schlauch eingeführt und durchgeschoben, bis diese ca. drei cm überstand. Zum Schutz der offen liegenden *Silica*-Kapillare wurde anschließend ein kleiner Polyethylen-Schlauch (*Outlet*, PE 10/30, Schuberts Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wackersdorf) über die *Silica* gezogen (vgl. Abb. 2.8). Die Einstich- bzw. Verbindungsstelle von *Inlet* und *Outlet* wurde dann mit 2-Komponenten-Epoxydkleber (Uhu Plus Sofortfest®, Bühl) wasserdicht verschlossen. Nach der Trocknung des Klebers wurde die Klebestelle zusätzlich mit Klebeband fixiert.

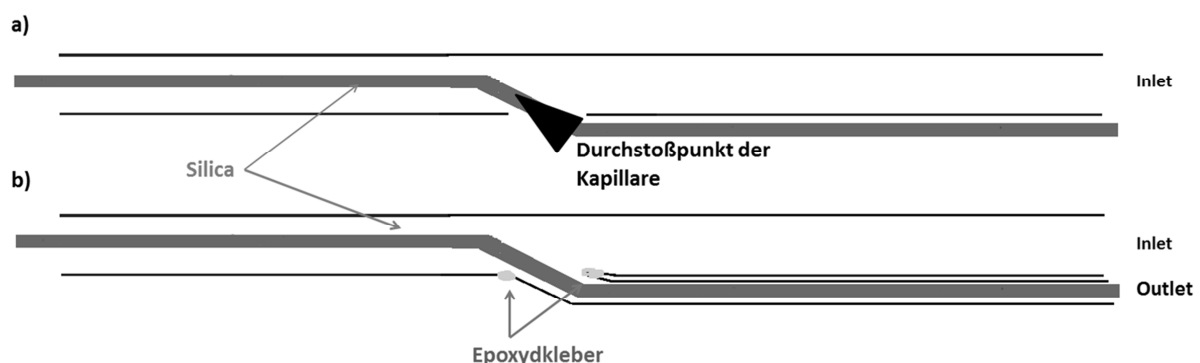


Abb. 2.8: Schematische Darstellung des Herstellungsverfahrens des Schlauchsystems.

II. Herstellung der Membranverbindung

Die Membran aus regenerierter Zellulose (Cut-off: 6 kDa) wurde freundlicherweise vom Institut für Experimentelle Psychologie der Universität Düsseldorf (Frau Priv.-Doz. Dr. A. de Souza Silva) zur Verfügung gestellt.

Im ersten Schritt wurde die Membran unter dem Mikroskop auf eine Länge von ca. 6 mm und der Polyimidschlauch (28G; professional plastics inc., Fullerton, CA, USA) auf 18 mm (entsprechend der Länge der Führungskanülen) zugeschnitten. Anschließend wurde die Membran so weit in den Polyimidschlauch hineingeschoben, dass ungefähr 4 mm herausragten. Mittels Epoxydkleber wurde die Verbindungsstelle zwischen Membran und Polyimidschlauch dicht verschlossen. Nach ausreichender Aushärtungszeit wurde die Membran auf 2,4 mm gekürzt und das offene Ende mit Epoxydkleber verschlossen (0,4 mm), sodass die gewünschte Membrangesamtlänge 2,0 mm beträgt (vgl. Abb. 2.9).

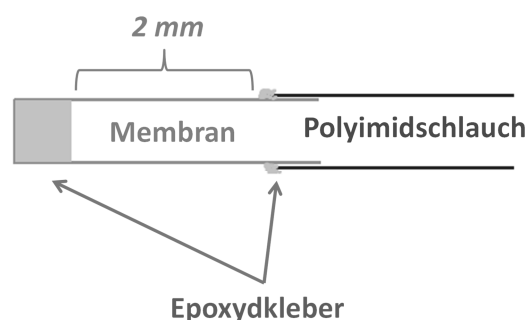


Abb. 2.9: Schematische Darstellung des Membransystems.

III. Fertigstellung der Sonden

Im letzten Schritt wurde das Polyimid-Membransystem mit dem Schlauchsystem zusammengeführt. Hierzu wurde zunächst eine Drahhülle (Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf) auf den kürzeren Teil des

Schlauchsystems gestülpt, um potentielle Beschädigungen der Sonden durch das Tier während der Ableitung zu verhindern. Anschließend wurden ein Gewinde und ein passgenau gefertigter Stopper (Werkstatt Forschungszentrum Jülich nach Boix *et al.* (1994); s. Abb. 2.10) aufgesetzt. Die *Silica*-Kapillare wurde daraufhin an die Länge der Führungskanüle angepasst und durch die Polyimid-Membran-Verbindung bis kurz vor die abschließende Klebestelle der Membran geschoben. Analog zu den anderen Verbindungsstellen wurde die Verbindung zwischen Polyimid und *Inlet* ebenfalls mit Epoxydkleber verschlossen. Nach ausreichender Aushärungszeit wurde der Stopper so weit vorgeschoben, dass beim Einführen der Sonden durch die Führungskanülen ausschließlich die 2,0 mm lange Membran herausstand. Die Endposition des Stoppers wurde im letzten Schritt mit Sekundenkleber fixiert.

Die fertige Dialysesonde wurde vor Gebrauch auf Funktionsfähigkeit überprüft, indem sie kurz vor Einführen mit Ringerlösung durchspült und an den Verbindungsstellen auf potenzielle Flüssigkeitsverluste untersucht wurde.

Die relative Wiederfindungsrate (%) der Sonden wurde in Vorversuchen bestimmt (s. 3.3.1).



Abb. 2.10: Aufbau der selbst hergestellten Sonde.

2.5.4 In vitro-Wiederfindungsrate

Die Wiederfindungsrate, auch Recovery genannt, ermöglicht die Beurteilung der Effizienz der mikrodialytischen Ableitung. Da die stetige Perfusion der Sonde den vollständigen Stoffaustausch verhindert (Muller, 2002), ist die

Schätzung der tatsächlichen Konzentration des Analyten in der Gewebeflüssigkeit unerlässlich.

In der in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihe wurde zur Bestimmung der prozentualen Wiederfindungsrate die Membran in eine Lösung mit bekannter Konzentration getaucht und wie folgt bestimmt.

Formel 2.3:

$$\text{Relative Wiederfindungsrate (\%)} = \frac{\text{dialysierte Konzentration}}{\text{vorgelegte Konzentration}} \times 100$$

Das Sammelintervall erfolgte analog zur Ableitung am wachen Tier. Hierbei wurden nach einer 7-stündigen Äquilibrierzeit alle zwei Stunden über insgesamt 28 Stunden, Proben gewonnen. Zeitgleich wurde mit jeder dialysierten Probe eine Standardprobe eingefroren. Da die zu Anfang bestimmte Adenosinkonzentration bei Raumtemperatur im Laufe der Zeit deutlich abnimmt (s. 3.3.1), wurde alle 6 bis 8 Stunden eine neue Standardlösung verwendet. Darüber hinaus wurden diverse Testreihen zur Bestimmung eines geeigneten Einfrierprotokolls generiert, um die Stabilität der bis zur Analyse gelagerten Proben zu gewährleisten (s. 3.3.1). Die Wiederfindungsrate ist unter anderem von der Länge der Dialysemembran und der Perfusionsrate abhängig (s. Abb. 2.11).

Die relative Wiederfindungsrate nähert sich theoretisch 100% bei einer minimalen Flussgeschwindigkeit und maximaler Membranlänge. Zwar gilt: „Je größer die Membran, desto höher die Wiederfindungsrate“, aber dem stehen kleine anatomische Strukturen, wie z.B. die kortikalen Hirnregionen, als limitierender Faktor gegenüber. Daher darf zur Erlangung von optimalen Wiederfindungsraten die Flussrate nicht zu niedrig eingestellt werden, da ebenfalls ausreichend Dialysatflüssigkeit zur späteren, quantitativen Analyse generiert werden muss. Aus diesem Grunde ist bei der Einstellung der

Parameter ein Abwägen der verschiedenen Einflussfaktoren im Hinblick auf das individuelle Zielgewebe sowie der analytischen Methode nötig.

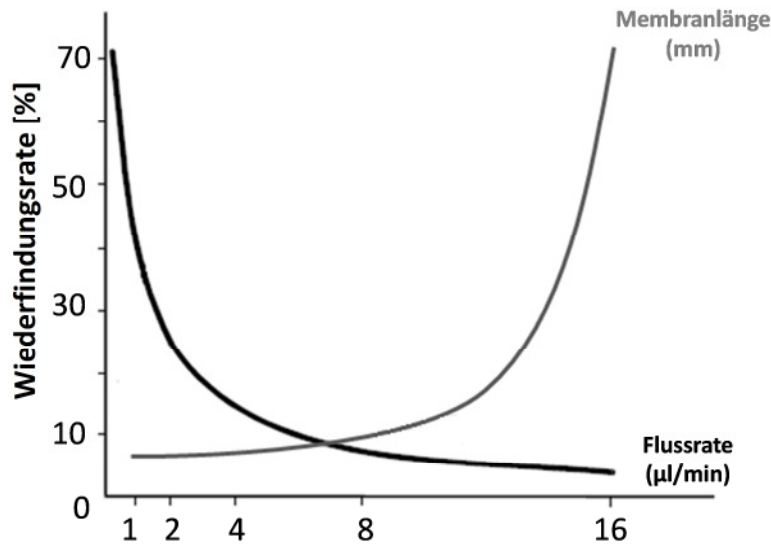


Abb. 2.11: Der Einfluss von Membranlänge und Flussrate auf die relative Wiederfindungsrate nach CMA Mikrodialysis, Schweden.

2.5.5 Implantation der Führungskanülen

Das Tier wurde während des operativen Eingriffs inhalativ mit Isofluran anästhesiert (s. 2.3). Aufgrund der fehlenden Analgesie des Inhalationsanästhetikums erfolgte unmittelbar nach der Narkoseeinleitung eine subkutane Schmerzmittelgabe (Rimadyl®; Carprofen, 5 mg Carprofen/kg KG; Wirkeintritt: 30 min), sodass die analgetische Wirkung zum Zeitpunkt der Präparation der Schädeldecke sowie der anschließenden Trepanation vollständig ausgebildet war.

Innerhalb des kurzen, analgesiefreien Zeitrahmens wurde der Schädel des narkotisierten Tieres in einer stereotaktischen Apparatur fixiert (nicht invasiv) und nach Rasur mit Braunol desinfiziert. Nach lokaler Betäubung mit Lidocain erfolgten eine ca. 3 bis 4 cm lange Hautinzision in der Mittellinie des Schädels und die Freipräparation bis zum Schädelknochen. Zwei Bohrtrepanationen

(ca. $\varnothing = 1,4$ mm) wurden auf Höhe des FC und des Thalamus, und zwei weitere ($\varnothing = 0,96$ mm) für die Fixationsschrauben (Basinc, West Lafayette, IN, USA) gegenüberliegend auf der anderen Hemisphäre bis auf die *Dura mater* durchgeführt. Nachdem der Schädelknochen mittels Ethanol-beträufelten Tupfern von Fettrückständen gesäubert worden war, wurden die Fixationsschrauben vorsichtig in die jeweiligen Bohrlöcher gedreht. Entscheidend war hierbei ein fester Halt, ohne dabei jedoch Impressionen auf der Hirnoberfläche entstehen zu lassen.

Im Anschluss wurden die Führungskanülen (Boix *et al.*, 1994) (s. Abb. 2.12) nacheinander in die Bohrlöcher für die kortikalen (+3,2 mm anteroposterior, +3,5 mm mediolateral, -2,0 mm dorsalventral) und thalamischen Zielregionen (-3,0 mm anteroposterior, +3,0 mm mediolateral, -4,0 mm dorsalventral nach Paxinos und Watson (1998)) eingeführt. Hierzu wurde zunächst eine Führungskanüle in den Stereotaktenaufsatz eingeschraubt, vorsichtig auf die gewünschte Tiefe abgesenkt und mittels Dentalzement (Instech Laboratories inc., Plymouth Meeting, PA, USA) im Verbund mit der Verankerungsschraube (s. Abb. 2.12) fixiert. Nach initialer Aushärtung des Dentalzements wurde der Schädel aus dem Stereotaktenarm gelöst und die Wundränder aufgefrischt. Zur dauerhaften Fixierung wurde anschließend die Kontaktfläche des Zements über die Wundränder hinaus, jedoch unter Aussparung des Außengewindes der Führungskanüle, vergrößert.

Um den durch die Führungskanülen gebildeten Kanal langfristig offen zu halten, wurden abgestumpfte Stahlkanülen als *Dummys* (Terumo, Neolus, 26G, s. Abb. 2.12) in die Führungskanülen eingeführt. Abschließend wurden mit Klebeband umwickelte Kabelbinder in Form eines Halsbandes angelegt, die während des Versuchs an der Zugausgleichsverbindung befestigt werden konnten.



Abb. 2.12: Übersicht über Führungskanüle, Gewinde, Dummy und Schraube.

2.5.6 Postoperative Nachsorge

Zur postoperativen Nachsorge erhielt jedes Tier zur Schmerzprophylaxe eine dreitägige subkutane Schmerzmedikation (5 mg Carprofen/kg KG/d).

Es erfolgte eine tägliche intensive Nachbeobachtung einschließlich Gewichtskontrollen. Der Allgemeinzustand und die Schmerzbelastung wurden anhand eines internen Erhebungsbogens beurteilt. Dieser umfasste zusätzliche Parameter wie Spontanverhalten und Wundheilung. Des Weiteren wurde auf allgemeine Belastungsanzeichen wie verminderte Nahrungsaufnahme oder anormale Kopfhaltung geachtet. Als Abbruchkriterium wurde eine schwerwiegende Belastung ohne Besserung der Symptomatik innerhalb von 24 Stunden definiert.

2.5.7 Versuchsaapparatur (Mikrodialysebox)

Die mikrodialytische Ableitung am wachen Tier erfolgte in einer im Institut entwickelten und in den FZJ-Werkstätten angefertigten Mikrodialysebox (150 cm x 83 cm x 80 cm) (Abb. 2.13). Die Box verfügt über ein eigenes Belüftungs- sowie programmierbares Belichtungssystem. Die in der Decke befindlichen Öffnungen ($d = 5$ cm) dienen der Ausleitung der Mikrodialyse-Systeme (Dialyseschläuche und Zugausgleichsverbindung). Außen auf der Box wurden mittig die Pumpe und seitlich jeweils ein Balancearm mit einem Zwei-Kanal-Swivel (s. Abb. 2.14) aufgestellt. Der Balancearm gestattet den Tieren eine gewisse Bewegungsfreiheit während der Ableitung. Der Swivel mit seinem unteren freidrehenden Teil soll verhindern, dass die Ableitungsschläuche verdrillen. Darüber hinaus wurden am freibeweglichen Teil des Swivels, Halterungen für die Eppendorf®-Gefäße sowie eine Zugausgleichsverbindung angebracht. Die Zugausgleichsverbindung wurde während des Versuchs am Halsband des Tieres befestigt und sollte bei ruckartigen Bewegungen eine Diskonnektion des Systems verhindern.

Im Innern der Mikrodialysebox herrschten GV-SOLAS-konforme Haltungsbedingungen mit einer Temperatur von 20 bis 23 °C und einer Lichtstärke von 108 LUX in der Hell-Phase (7 – 19 Uhr) sowie < 0,5 Lux in der Dunkelphase (19 – 7 Uhr). Zur Evaluierung des Allgemeinzustandes während der Messung erfolgte alle zwei Stunden und in Verdachtsfällen stündlich eine intensive, aber störfreie Begutachtung der Tiere über das außerhalb der Box befindliche Videokamerasystem. Zur Unterstützung bestand weiterhin die Möglichkeit, die Tiere in der Dunkelphase mit Rotlicht (ca. 25 Lux), das von Albinoratten nicht wahrgenommen werden kann (Weiss *et al.*, 2014), zu beobachten. Die Tiere hatten zu jeder Zeit der Messung freien Zugang zu Futter und Wasser.

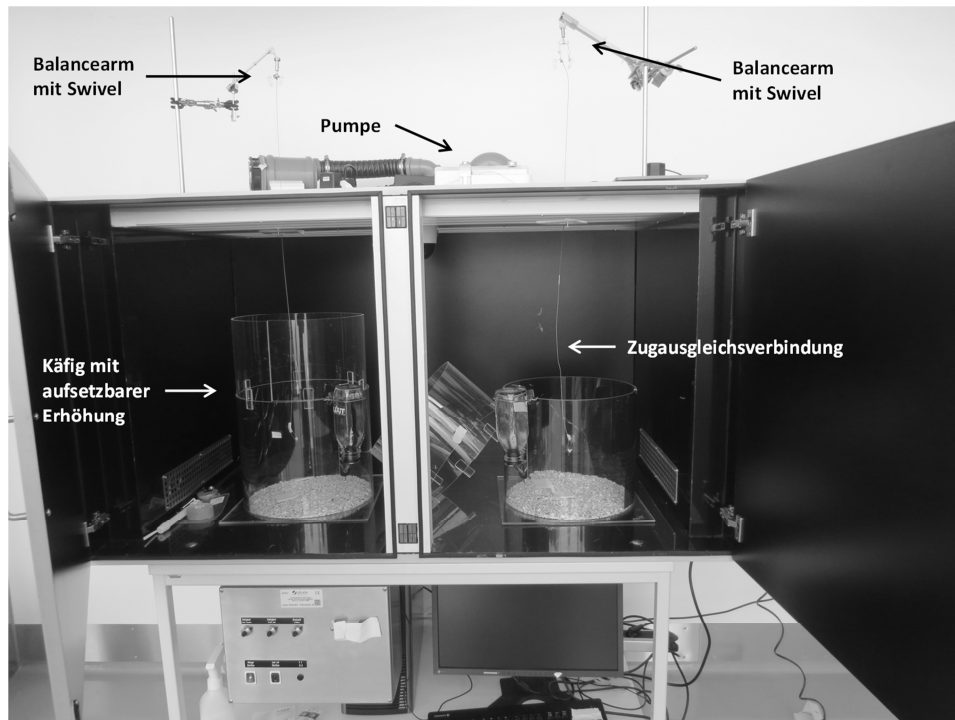


Abb. 2.13: Ansicht der Mikrodialysebox.

2.5.8 Mikrodialytische Ableitung

Mindestens drei Tage vor Versuchsbeginn wurden je zwei Tiere zur Gewöhnung einzeln mit ihren nach oben offenen Käfigen, in denen sie sich frei bewegen konnten, in die Mikrodialysebox (s. Abb. 2.13) gesetzt. Darüber hinaus wurden die Tiere für mehrere Stunden an die Zugausgleichsverbinding gewöhnt. Die Käfige waren mit einer aufsetzbaren Erhöhung ausgestattet, die gewährleistete, dass die Tiere nicht hinausklettern konnten.

Frühestens eine Woche nach der stereotaktischen Operation fanden die In vivo–Ableitungen statt. Mindestens sieben Stunden vor der ersten Dialysatprobe wurden zunächst die *Dummys* unter Isoflurankurznarkose (s. 2.3) entfernt und die Sonden anschließend über die Führungskanülen eingeführt und fixiert. Die Dauer der Narkose betrug für diese Schritte kontrolliert vier Minuten. In der Aufwachphase wurden die Tiere vorsichtig in die mittig unter den Durchführungsöffnungen der Mikrodialysebox befindlichen Käfige gesetzt und die Zugausgleichsverbinding am Halsband des

Tieres befestigt. Die Dialyseschläuche wurden anschließend durch die Öffnung nach außen geführt und mit dem freidrehenden Teil des *Swivels* verbunden (s. Abb. 2.14). Über den oberen, starren Teil des *Swivels* erfolgte die Verbindung zur Mikrodialysepumpe.

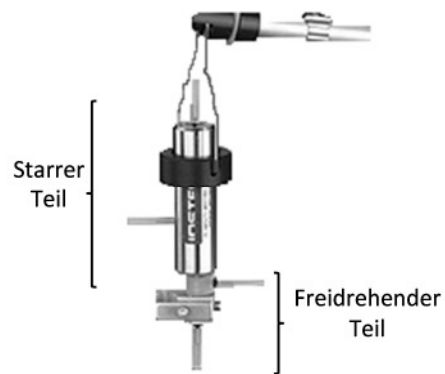


Abb. 2.14: mikrodialytischer *Swivel* nach Instechlabs, Plymouth, USA.

Zur Vermeidung von Luftblasen wurden die Pumpschläuche vor Versuchsbeginn vorgefüllt und die Pumpe eingeschaltet. Abschließend wurde das *Outlet* an ein Eppendorf®-Gefäß fixiert und in seine *Swivel*-Vorrichtung eingehängt. Das Dialysesystem wurde mit einer Flussrate von $1,5 \mu\text{l}/\text{min}$ mit künstlicher Liquorflüssigkeit (Ringerlösung AlleMan Pharma, Ringbach; pH 7,4) perfundiert. Zur weiteren Stabilisierung der Sonden wurde das unter Narkose aufgeschraubte Gewinde an die Führungskanüle zementiert.

Vor der ersten Dialysatprobe wurde das System sieben Stunden lang äquilibriert, so dass sich ein Adenosinfließgleichgewicht (Porkka-Heiskanen *et al.*, 2000) für die Ermittlung des Ausgangswertes einstellen konnte. Anschließend erfolgte im 2-Stundenintervall die 24- bis 26-stündige Dialysatgewinnung. Hierbei wurde die Zeit, die die Lösung bis zur *Outlet*-Spitze benötigt, präzise ermittelt und das Sammelintervall an den Licht-Wechsel angepasst. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Nach Versuchsende wurden die Tiere von der Mikrodialyse-Einheit getrennt und in tiefer Isoflurannarkose dekapitiert. Zur Überprüfung der Sondenlage wurden weitere In vitro-Untersuchungen durchgeführt (s. 2.5.9).

2.5.9 In vitro-Untersuchungen

Um die tatsächliche Position der Mikrodialysesonden zu ermitteln, wurden die Gehirne der untersuchten Tiere postmortem untersucht. Dazu wurden die Gehirne nach dem Freipräperieren (inklusive der Entfernung der Führungskanülen) über einen Zeitraum von fünf Tagen in 4 %-iger Formalin-Lösung fixiert und anschließend koronale Schnitte (50 μm) am Kryostaten (Leica, Wetzlar) angefertigt (Kammertemperatur ca. $-21 \pm 1^\circ\text{C}$; Objekttemperatur ca. $-18 \pm 1^\circ\text{C}$).

Zur exakten anatomischen Bestimmung der Lage der Membran wurden 6 bis 10 Schnitte der jeweiligen Hirnregion nach Nissl mit Kresylviolett gefärbt (vgl. Mulisch und Welsch (2010)). Dies ermöglicht eine spezifische und selektive Darstellung des Nervengewebes mit seinen Bestandteilen (Hermey *et al.*, 2010).

2.5.10 Analytik des Dialysats

Für die Analyse des Stoffgehaltes der in einem Mikrodialyseversuch gewonnenen Proben müssen sehr sensitive Methoden herangezogen werden, da zum einen die Konzentrationen der gesuchten Substanzen im nanomolaren Bereich (10^{-9} Mol) und zum anderen die Probenvolumina im Mikroliter-Bereich (10^{-6} L) liegen (de Lange *et al.*, 2000). Zur Quantifizierung von extrazellulärem Adenosin im Mikrodialysat beträgt die Zielnachweis- bzw. -bestimmungsgrenze 1 bis 2 nM, da bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass die Ausgangskonzentration von Adenosin im Dialysat des BFs ca. 2 nM und des FCs ca. 6 nM beträgt (Kalinchuk *et al.*, 2011). Aus diesem

Grund erfolgte die Analyse über die HPLC (de Lange *et al.*, 2000). Bei der chromatografischen Auftrennung von Stoffgemischen mittels HPLC wird eine mobile (flüssige) Phase, welche die zu detektierenden Substanzen enthält, durch hohen Druck über eine stationäre Phase geleitet. An dieser Stelle erfolgt die Auftrennung des Stoffgemisches, wobei die unterschiedlichen chemischen und physikochemischen Eigenschaften (z.B. Löslichkeit) der Substanzen ausgenutzt werden.

Vorversuche haben gezeigt, dass die Zielnachweis- bzw. -bestimmungsgrenze von 1 bis 2 nM ausschließlich mithilfe der hochsensitiven und selektiven Massenspektrometrie detektiert werden kann. Alle massenspektrometrischen Untersuchungen wurden vom Zentralinstitut für Engineering, Elektronik und Analytik (ZEA-3) des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Bei der MS-gekoppelten HPLC werden zwei verschiedene Trenntechniken, die analytische HPLC und das Massenspektrometer (MS), kombiniert eingesetzt. Durch diese Kopplung wird der Analyt zunächst mit verschiedenen Ionisationsarten (*hier*: Elektrospray-Ionization) ionisiert. Anschließend werden im Analysator die Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt.

Bei der HPLC-Analyse wurde die Trennung auf einer Zorbax Eclipse-Plus-C18-Säule 100 x 4,6 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) mit einer konstanten Flussrate von 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ erreicht. Die Injektion von jeweils 20 μL Probe, die mittels Autosampler auf eine konstante Temperatur von 8 °C gehalten wurde, erfolgte automatisiert. Die mobile Phase bestand zum einen aus 20 mM Ammoniumacetatlösung und zum anderen aus Acetonitril mit 0,1%-iger Ameisensäure. Bei dem verwendeten Triple-Quadrupol-Gerät Qtrap 6500 Instrument (ABSciex®, Darmstadt), gekoppelt mit einer Agilent-HPLC, erfolgt die zur Strukturaufklärung erforderliche Fragmentierung durch die Kopplung von mehreren Analysatoren hintereinander. In dieser Studie erfolgte die hochsensitive Quantifizierung von Adenosin durch das „Multiple

Reaction Monitoring’, der gezielten Betrachtung einzelner Fragmentationen. Es wurde das Vorläuferion und die zwei am häufigsten vorkommenden Produktionen (m/z 268 \rightarrow m/z 136; m/z 268 \rightarrow m/z 119) zur Quantifizierung von Adenosin herangezogen (s. Abb. 2.15). Die Datenerfassung sowie –verarbeitung wurde mit der Software Analyst 1.6.1 (ABSciex, Darmstadt) und die quantitative Bestimmung mit der Software Multiquant (ABSciex, Darmstadt) durchgeführt. Alle Proben wurden in dreifacher Ausführung gemessen. Aufgrund der hohen Instabilität von Adenosin bei Raumtemperatur wurde darüber hinaus nach insgesamt 15 Durchgängen eine Standardprobe als Qualitätsstandard erneut gemessen.

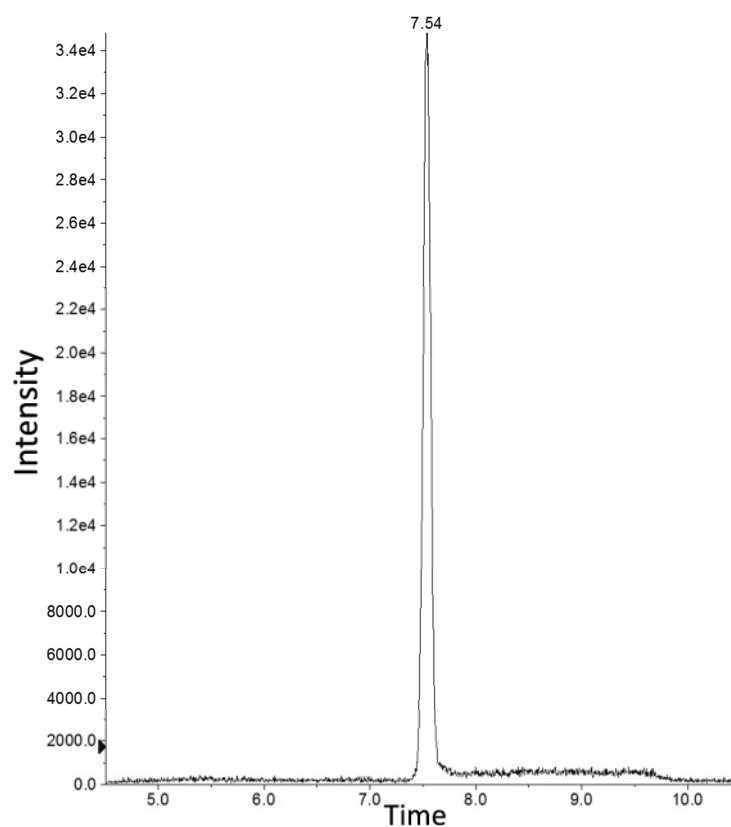


Abb. 2.15: Beispiel eines Chromatogramms einer 10 nM Standardlösung, gemessen an der MS–gekoppelten HPLC (ZEA–3, Forschungszentrum Jülich).

2.6 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mithilfe von Microsoft® Excel® (2010, Microsoft Corporation, Redmont, USA) verwaltet. Die anschließende statistische Auswertung wurde mit dem Programm SPSS® für Windows (Version 22, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

I. Deskriptive Statistik

Die Messergebnisse der einzelnen Versuchsteile wurden durch das arithmetische Mittel \bar{x} zusammengefasst und Abweichungen davon jeweils als Standardabweichung σ dargestellt. Die angewandte Gleichung zur relativen Standardabweichung bzw. zu dem Variationskoeffizienten ist in Formel 2.4 aufgeführt. Darüber hinaus wurden absolute, sowie relative Differenzen (s. Formel 2.5 und Formel 2.6) zwischen der Kontroll- (Wert 1) und Koffeingruppe (Wert 2) bestimmt. Für die mikrodialytischen Messungen wurde darüber hinaus der interindividuelle Quotient berechnet (vgl. Formel 2.7)

Formel 2.4:

$$\text{Relative Standardabweichung [\%]} = \frac{\sigma}{\bar{x}} * 100$$

Formel 2.5:

$$\text{Absolute Differenz} = \text{Wert 2} - \text{Wert 1}$$

Formel 2.6:

$$\text{Relative Differenz (\%)} = \frac{\text{Absolute Differenz}}{\text{Wert 1}} \times 100$$

Formel 2.7:

$$\text{Interindividuelle Quotient} = \frac{\text{Wert 2}}{\text{Wert 1}}$$

II. Explorative Statistik

Nach Überprüfung der Ergebnisse auf Normalverteilung (Shapiro–Wilk–Test) wurden dementsprechend parametrische bzw. nichtparametrische Verfahren ausgewählt. In dieser Arbeit wurden in jedem Versuchsteil folgende statistische Testverfahren durchgeführt:

Parametrische Daten (Allgemeine Ergebnisse, PET–Daten)

Klassischer Levenetest:

Prüfung auf Varianzhomogenität

Student’s gepaarter t–Test:

Mittelwert–Vergleich zweier abhängiger und normalverteilter Stichproben

Student’s ungepaarter t–Test:

Mittelwert–Vergleich zweier unabhängiger und normalverteilter Stichproben

Mauchly–Test mit Greenhouse–Geisser–Korrektur:

Test auf Sphärizität bei einem kleinen Stichprobenumfang

Repeated measurement ANOVA (rmANOVA):

Varianzanalyse für Messwertwiederholungen zwischen mehr als zwei abhängigen Stichproben (*Innersubjektfaktoren: Region und Scan*); Signifikante Unterschiede wurden anschließend weiter mit einem gepaarten bzw. ungepaarten Zwei–Stichproben–t–Test analysiert

*Nichtparametrische Daten (Mikrodialyse–Daten)*Nichtparametrischer Levenetest:

Prüfung auf Varianzhomogenität nach Nordstokke und Zumbo (2010)

Matched–Paired Wilcoxon–Test:

Vergleichender Rangsummentest bei zwei abhängigen Stichproben

Mann–Whitney–U–Test:

Vergleichender Rangsummentest bei zwei unabhängigen Stichproben

Spearman–Korrelation:

Korrelationsanalyse zwei unabhängiger, nichtparametrischer Variablen

Post–Hoc–Analyse

Bei signifikanten Unterschieden und Mehrfachvergleichen wurde *post–hoc* das Bonferroni–Verfahren durchgeführt. Dabei wird um die Anzahl der durchgeführten Testverfahren (wie z.B. bei der rmANOVA) korrigiert. Das neue Signifikanzniveau α wird wie folgt berechnet:

Formel 2.8:

$$\text{neues Signifikanzniveau } \alpha = \frac{0,05}{\text{Anzahl durchgeführter Testverfahren}}$$

Zur robusteren *post–Hoc* Analyse kann das modifizierte Bonferroni–Holmes–Verfahren durchgeführt werden. Dabei werden die ermittelten Signifikanz–Werte (p–Werte) der einzelnen Testverfahren aufsteigend sortiert und den aufsteigenden α –Werten zugeordnet. Ein p–Wert gilt als signifikant, wenn er sein eigenes Signifikanzniveau α nicht überschreitet.

3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden zunächst die allgemeinen Parameter der Tierexperimente sowie die Ergebnisse zu den Effekten der chronischen Koffeingabe auf die A₁AR–Expression beschrieben. Danach folgen die Resultate der mikrodialytischen Analyse der zirkadianen sowie koffeininduzierter adenosinerger Prozesse. Dabei werden zunächst die Vorversuche (Stabilität der Adenosinlösungen und Wiederfindungsraten), anschließend die Ergebnisse der In vivo–Quantifizierung von extrazellulärem Adenosin und schließlich die anatomische Bestimmung der Sondenlage dargestellt.

3.1 Allgemeine Parameter

Analog zu Alhaider *et al.* (2010), Pettenuzzo *et al.* (2008) sowie Georgiev *et al.* (1993) traten keine signifikanten Unterschiede bei der täglichen Wasseraufnahme im Vergleich von Koffein– und Kontrollgruppe auf. Ein Zusammenhang zwischen Koffeingabe und assoziierten Gewichtsveränderungen konnte in Übereinstimmung mit Rhoads *et al.* (2011) ebenfalls nicht gefunden werden.

Die *per os* aufgenommene Koffeinmenge betrug durchschnittlich $29,37 \pm 1,45$ mg/kg KG/d für den PET– und $29,55 \pm 1,98$ mg/kg KG/d für den Mikrodialyse–Teil (vgl. Tabelle 3.1) und lagen damit nahe der intendierten Zielmenge von 30 mg/kg KG/d. Diese entspricht beim Menschen einem Kaffeekonsum von 4 bis 5 Tassen Kaffee/d (vgl. 2.2). Die Daten zur Koffeinaufnahme sind in Tabelle 3.1 für die PET– und Mikrodialyse–Studie aufgeführt.

Tabelle 3.1: Gewicht, Trinkmenge und rechnerische Koffeinaufnahme bei 12-wöchiger Koffein- bzw. Vehikelapplikation für die PET- und Mikrodialyse-Studie

Parameter	Studienteil	Gruppe	Maximum	Minimum	$\bar{x} \pm \sigma$	p-Wert
Gewicht über Applikationszeitraum [g]	PET	Koffein	581,53	542,67	558,93 ± 16,57	0,075
		Kontrolle	719,14	571,36	635,39 ± 69,10	
	Mikrodialyse	Koffein	569,61	490,86	542,68 ± 37,18	0,877
		Kontrolle	543,32	506,63	528,20 ± 20,19	
Trinkmenge [mL]	PET	Koffein	44,38	36,32	39,88 ± 3,37	0,374
		Kontrolle	46,76	38,92	42,14 ± 3,30	
	Mikrodialyse	Koffein	45,86	39,28	43,68 ± 4,42	0,383
		Kontrolle	49,81	37,83	43,33 ± 3,94	
Koffeinaufnahme [g/L]	PET	Koffein	0,44	0,36	0,41 ± 0,04	
	Mikrodialyse		0,41	0,34	0,37 ± 0,04	
Koffeinmenge [mg/Tier/d]	PET	Koffein	17,38	15,59	16,55 ± 0,87	
	Mikrodialyse		16,88	15,47	16,10 ± 1,15	
Koffeinmenge [mg/kg KG/d]	PET	Koffein	30,97	27,64	29,37 ± 1,45	
	Mikrodialyse		33,38	27,57	29,55 ± 1,98	

Anm.: p-Werte wurden über den ungepaarten t-Test ermittelt ($p < 0,05$).

3.2 Die Effekte einer chronischen Koffeingabe auf die A₁AR-Expression im ZNS der Ratte mittels [¹⁸F]CPFPX-PET

Die Parameter der PET-Messungen sind in Tabelle 3.2 tabellarisch zusammengefasst. Die beiden untersuchten Gruppen (Kontrolle und Koffein) unterscheiden sich nicht in Bezug auf die Parameter Startzeit der Messung, Dauer der Anästhesie bis zur PET-Messung sowie injizierter Dosis bzw. Stoffmenge.

Tabelle 3.2: Scanparameter für die fünf PET-Messungen

Parameter	Gruppe	BL	Tag 1	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Intraindividueller p-Wert	Inter-individueller p-Wert
Gewicht [g]	<i>Koffein</i>	450,75 ± 34,25	602,63 ± 39,10	596,13 ± 37,81	594,38 ± 40,29	597,25 ± 37,74	vgl. Tabelle 3.3	0,013*
	<i>Kontrolle</i>	450,75 ± 14,08	687,88 ± 69,21	679,00 ± 72,40	670,38 ± 77,19	666,5 ± 75,46		
Start der PET-Messung [hh:mm]	<i>Koffein</i>	13:54 ± 0:41	13:45 ± 0:12	13:21 ± 0:28	13:11 ± 0:28	13:25 ± 0:29	0,406	0,395
	<i>Kontrolle</i>	13:31 ± 0:41	12:58 ± 0:48	12:59 ± 0:48	12:42 ± 1:06	12:58 ± 0:52	0,452	
Anästhesiedauer bis PET-Messung [hh:mm]	<i>Koffein</i>	1:06 ± 0:27	0:57 ± 0:15	0:56 ± 0:23	0:45 ± 0:10	0:46 ± 0:11	0,193	0,125
	<i>Kontrolle</i>	0:56 ± 0:11	0:50 ± 0:10	0:46 ± 0:10	0:50 ± 0:20	0:41 ± 0:10	0,268	
Injizierte Dosis [MBq]	<i>Koffein</i>	20,63 ± 2,28	18,82 ± 2,73	19,33 ± 3,53	20,37 ± 1,16	20,56 ± 2,39	0,515	0,645
	<i>Kontrolle</i>	20,16 ± 1,51	19,12 ± 1,53	20,35 ± 1,81	20,34 ± 2,28	18,59 ± 1,39	0,164	
Injizierte Stoffmenge [nmol]	<i>Koffein</i>	0,40 ± 0,28	0,54 ± 0,40	0,40 ± 0,17	0,39 ± 0,14	0,42 ± 0,23	0,776	0,123
	<i>Kontrolle</i>	0,56 ± 0,32	0,43 ± 0,20	0,20 ± 0,11	0,25 ± 0,08	0,30 ± 0,15	0,004*	

Parameter werden als $\bar{x} \pm \sigma$ dargestellt; n = 8 pro Gruppe; während der p-Wert der Gewichte mit einer rmANOVA berechnet wurden, wurden die restlichen Parameter mit einer univariaten Varianzanalyse ermittelt; signifikante Unterschiede sind mit * dargestellt (p < 0,05).

Signifikante Unterschiede traten innerhalb der Kontrollgruppe bezüglich der injizierten Stoffmenge ($p < 0,05$) auf. Die maximale injizierte Stoffmenge betrug 0,56 nM und liegt somit immer noch deutlich unter dem von Elmenhorst *et al.* (2013) ermittelten Dosislimit von 2,3 nM für eine maximal 5 %–Blockade des Rezeptors (vgl. 4.3.2). Folglich ist, gemäß dem Tracerprinzip, eine pharmakologische Beeinflussung des Rezeptors durch den Radiotracer auszuschließen.

Die Gewichtsunterschiede, die sich gleichermaßen in Verum– und Kontrollgruppe nach 12 Wochen zeigten, entsprechen den üblichen Gewichtszunahmen bei Ratten in der Käfighaltung. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der ersten PET–Messung jedoch mindestens zwölf Wochen alt und somit ausgewachsen. Die Reifungsprozesse im Gehirn waren daher zu Beginn der Messreihe bereits abgeschlossen. Weitere Unterschiede wurden nicht gefunden (vgl. Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Intraindividueller Vergleich der Gewichte für alle Messzeitpunkte

Gewicht										
Gruppe	p–Wert									
	BL vs. Tag 1	BL vs. Tag 2	BL vs. Tag 4	BL vs. Tag 7	Tag 1 vs. Tag 2	Tag 1 vs. Tag 4	Tag 1 vs. Tag 7	Tag 2 vs. Tag 4	Tag 2 vs. Tag 7	Tag 4 vs. Tag 7
<i>Koffein</i>	<0,002*	<0,002*	<0,002*	<0,002*	0,43	0,39	0,63	1,00	1,00	1,00
<i>Kontrolle</i>	<0,002*	<0,002*	<0,002*	<0,002*	0,10	0,08	0,12	0,22	0,90	1,00

Gewichte werden als $\bar{x} \pm \sigma$ dargestellt; $n = 8$ pro Gruppe; signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$, rmANOVA).

Im Rahmen der Analyse der PET-Befunde wurden parametrische Mittelwertsbilder erzeugt ($n = 8$, s. Abb. 3.1). Sie zeigen die durchschnittliche Bindung von $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ an den $A_1\text{AR}$ im Rattenhirn zu verschiedenen Messzeitpunkten.

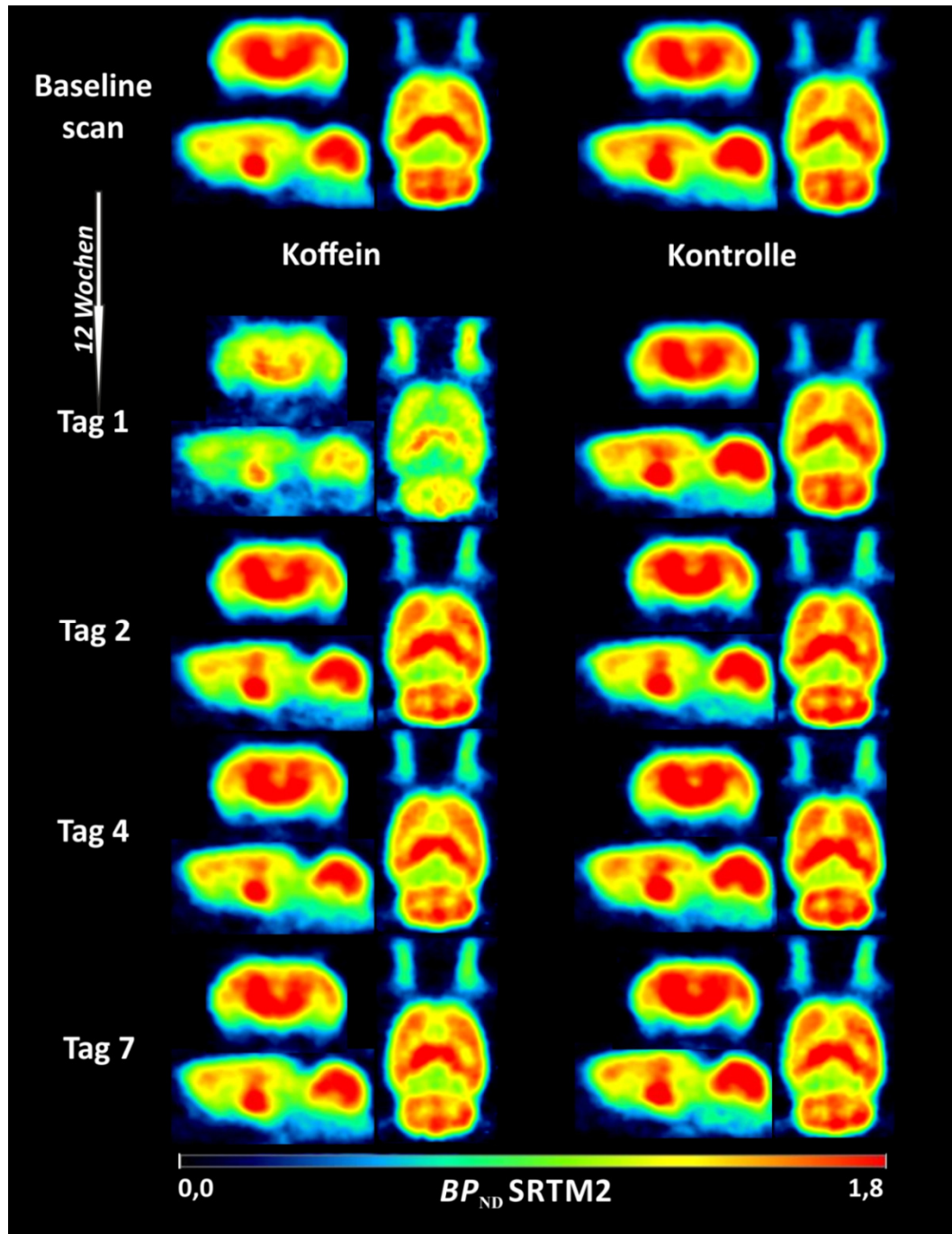


Abb. 3.1: Parametrische Mittelwertsbilder ($n = 8$) des BP_{ND} von Koffein- und Vehikel-Gruppen. Koronale (links oben), Sagittale (*links, unten*) und horizontale Darstellung (*rechts*).

Bei der visuellen Betrachtung der parametrischen Mittelwertsbilder wird bereits deutlich, dass die koffeinbehandelten Tiere bei der zweiten Messung (Tag 1) niedrigere BP_{ND} -Signale im Vergleich zur Kontrolle aufweisen. Die anschließenden quantitativen Analysen (global sowie in spezifischen Hirnregionen) bestätigen diesen Eindruck (Abb. 3.2, Tabelle 3.4 und Tabelle 3.5).

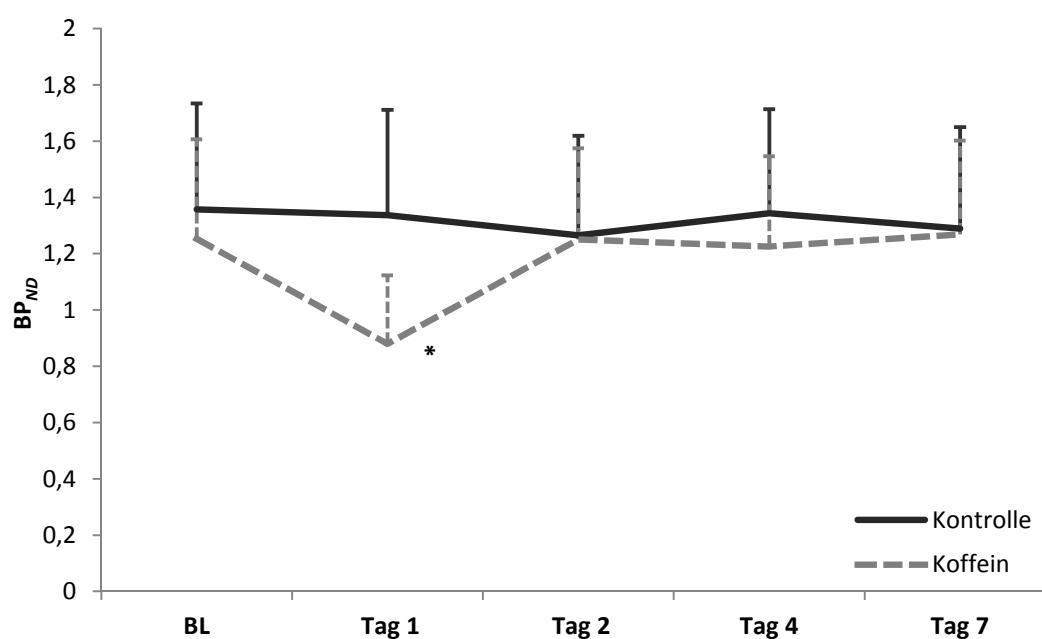


Abb. 3.2: Gesamt- BP_{ND} s der Koffeingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Anm.: Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet

($p < 0,05/5$, rmANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur).

Die an Tag 1 nach Absetzen des Koffeins (nach ca. 4 h) sichtbare Abnahme in $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ -Bindung beträgt ca. $34 \pm 2\%$ (im Vergleich zur Kontrollgruppe). Bei allen folgenden Messungen (Tag 2 bis Tag 7) weichen die Ergebnisse von Verum- und Kontrollgruppe nicht signifikant voneinander ab.

Im Allgemeinen werden besonders starke BP_{ND} -Signale und demnach hohe $A_1\text{AR}$ -dichten analog zu Kroll *et al.* (2014) in Thalamus, Caudatus Putamen, Hippokampus und Zerebellum ermittelt (vgl. Tabelle 3.4.), während der Hypothalamus und Ncl. accumbens eine geringere $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ -Bindung (und somit $A_1\text{AR}$ -Dichte) zeigen.

Tabelle 3.4: Mittlere regionale BP_{ND}-Werte von [¹⁸F]CPFPX (± Standardabweichung) der Koffein- und Kontrollgruppe

		BL	Tag 1	Tag 2	Tag 4	Tag 7
Kortex	<i>Koffein</i>	1,088 ± 0,145	0,722 ± 0,148	1,061 ± 0,092	1,060 ± 0,111	1,083 ± 0,087
	<i>Kontrolle</i>	1,143 ± 0,139	1,072 ± 0,152	1,020 ± 0,151	1,075 ± 0,170	1,042 ± 0,154
Zingulum	<i>Koffein</i>	1,203 ± 0,187	0,820 ± 0,209	1,201 ± 0,105	1,213 ± 0,138	1,227 ± 0,148
	<i>Kontrolle</i>	1,294 ± 0,125	1,70 ± 0,158	1,214 ± 0,156	1,279 ± 0,156	1,255 ± 0,163
Caudatus Putamen	<i>Koffein</i>	1,391 ± 0,224	0,962 ± 0,206	1,390 ± 0,113	1,369 ± 0,164	1,426 ± 0,20
	<i>Kontrolle</i>	1,542 ± 0,177	1,519 ± 0,195	1,437 ± 0,141	1,536 ± 0,214	1,451 ± 0,188
Hippokampus	<i>Koffein</i>	1,538 ± 0,266	1,112 ± 0,222	1,518 ± 0,104	1,488 ± 0,149	1,508 ± 0,193
	<i>Kontrolle</i>	1,703 ± 0,204	1,654 ± 0,198	1,553 ± 0,180	1,658 ± 0,213	1,610 ± 0,206
Thalamus	<i>Koffein</i>	1,748 ± 0,309	1,256 ± 0,244	1,755 ± 0,122	1,703 ± 0,137	1,786 ± 0,259
	<i>Kontrolle</i>	1,867 ± 0,268	1,864 ± 0,225	1,769 ± 0,250	1,880 ± 0,268	1,795 ± 0,221
Hypothalamus	<i>Koffein</i>	0,665 ± 0,107	0,510 ± 0,114	0,732 ± 0,066	0,697 ± 0,097	0,731 ± 0,145
	<i>Kontrolle</i>	0,744 ± 0,168	0,753 ± 0,144	0,693 ± 0,151	0,767 ± 0,142	0,730 ± 0,156
Ncl. accumbens	<i>Koffein</i>	0,927 ± 0,153	0,677 ± 0,185	0,980 ± 0,118	0,943 ± 0,165	0,987 ± 0,131
	<i>Kontrolle</i>	1,019 ± 0,155	1,013 ± 0,127	0,978 ± 0,010	1,033 ± 0,116	0,949 ± 0,117
Zerebellum	<i>Koffein</i>	1,467 ± 0,203	0,975 ± 0,219	1,363 ± 0,158	1,334 ± 0,144	1,406 ± 0,045
	<i>Kontrolle</i>	1,546 ± 0,177	1,553 ± 0,161	1,457 ± 0,207	1,520 ± 0,173	1,477 ± 0,175

Tabelle 3.5: Bindungspotenzial (BP_{ND}) von [^{18}F]CPFPX: p-Werte bei der inter- und intraindividuellen Analyse

		Interindividuelle Analyse					Intraindividuelle Analyse
		BL	Tag 1	Tag 2	Tag 4	Tag 7	
Kortex	<i>Koffein</i>	0,448	<0,002*	0,521	0,843	0,515	<0,002*
	<i>Kontrolle</i>						0,146
Zingulum	<i>Koffein</i>	0,468	<0,002*	0,382	0,264	0,318	<0,002*
	<i>Kontrolle</i>						0,659
Caudatus Putamen	<i>Koffein</i>	0,223	<0,002*	0,480	0,101	0,794	<0,002*
	<i>Kontrolle</i>						0,441
Hippokampus	<i>Koffein</i>	0,184	<0,002*	0,635	0,0855	0,325	<0,002*
	<i>Kontrolle</i>						0,296
Thalamus	<i>Koffein</i>	0,425	<0,002*	0,892	0,119	0,937	0,005*
	<i>Kontrolle</i>						0,524
Hypothalamus	<i>Koffein</i>	0,279	<0,002*	0,513	0,265	0,993	<0,002*
	<i>Kontrolle</i>						0,551
Ncl. accumbens	<i>Koffein</i>	0,2787	<0,01*	0,513	0,265	0,993	<0,002*
	<i>Kontrolle</i>						0,500
Zerebellum	<i>Koffein</i>	0,255	<0,002*	0,970	0,225	0,554	<0,002*
	<i>Kontrolle</i>						0,402

Anm.: Während die intraindividuellen p-Werte mit einer rmANOVA berechnet wurden, wurden die interindividuellen Unterschiede über den ungepaarten t-Test mit Bonferroni-Korrektur ermittelt. Signifikante Unterschiede sind mit * dargestellt ($p_{\text{intraindividuell}} < 0,05$ bzw. $p_{\text{interindividuell}} < 0,05/5$).

Intraindividuell bestehen innerhalb der Kontrollgruppe zwischen den einzelnen PET-Messungen keine signifikanten Unterschiede. Bei der dritten Messung (Tag 2) zeigt sich zwar global eine minimal niedrigere [^{18}F]CPFPX-Bindung, dieser Effekt unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von den anderen Werten (vgl. Abb. 3.3). Wahrscheinlich ist dieser Befund auf einen leichten Narkoseüberhang zurückzuführen, da weniger als 24 Stunden zwischen der zweiten und dritten Messung lagen (s. Kroll *et al.*, 2014). Im Allgemeinen beträgt die durchschnittliche, regionen- und scanunabhängige, relative Standardabweichung innerhalb der Kontrollgruppe $13,57 \pm 3,13$ %.

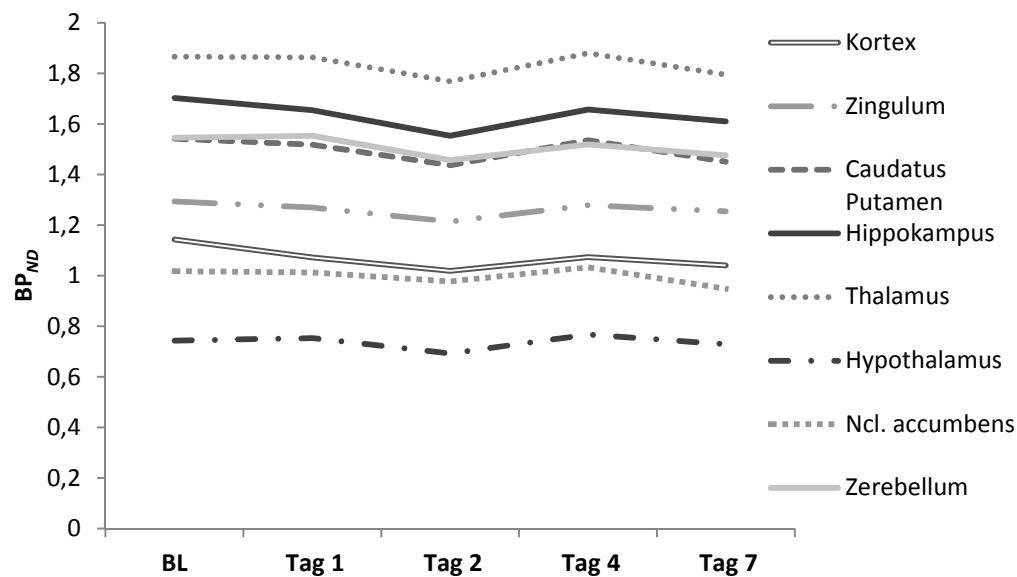


Abb. 3.3: Verlauf der mittleren BP_{ND} -Werte in der Kontrollgruppe in den untersuchten Regionen.

Bei intraindividueneller Betrachtung beträgt die durchschnittliche, regionen- und scanunabhängige relative Standardabweichung innerhalb der Koffeingruppe $14,73 \pm 5,56 \%$ und liegt somit minimal höher als innerhalb der Kontrollgruppe. Im zweiten Scan hingegen erhöht sich die relative Standardabweichung auf $22,35 \pm 2,75 \%$. Eine solche Erhöhung konnte bereits beim Menschen aufgezeigt werden (Bodenmann *et al.*, 2012; Grant *et al.*, 1983) und spricht wahrscheinlich für eine individuell unterschiedliche Ansprechrate der Tiere auf Koffein. Der Befund unterstreicht die gute Übertragbarkeit der tierexperimentellen Befunde im Rahmen dieser Studie.

Die weitere statistische Analyse der signifikanten Abnahme in $[^{18}\text{F}]\text{CPFPX}$ -Bindung zwischen der BL und der zweiten PET-Messung zeigte regionenspezifische Unterschiede innerhalb der Koffeingruppe. In diesem Zusammenhang verhalten sich Hypothalamus und Ncl. accumbens signifikant unterschiedlich verglichen mit den übrigen Regionen (mit Ausnahme des Kortex; vgl. Tabelle 3.6). Der p-Wert für den Vergleich von Kortex und Ncl. accumbens beträgt 0,003 und verfehlt somit die Signifikanzschwelle. Das

ist wahrscheinlich auf die geringe Stichprobenzahl ($n = 8$) zurückzuführen und bedürfte einer Überprüfung mit größerem Stichprobenumfang.

Zwar lagen im Hypothalamus und Ncl. accumbens signifikante Unterschiede verglichen zur Kontrollgruppe vor (s. Tabelle 3.4), jedoch konnten intraindividuell keine Unterschiede zwischen der BL- und der zweiten PET-Messung detektiert werden (vgl. Abb. 3.4).

Die fehlende Signifikanz bei Hypothalamus und Ncl. accumbens ist möglicherweise auf die geringe Größe dieser Regionen, die zudem niedrigere BP_{ND} -Werte und proportional höhere Standardabweichungen aufweisen, zurückzuführen (vgl. Tabelle 3.4). Besonders im Hypothalamus der Kontrollgruppe wird eine überdurchschnittliche, relative Standardabweichung von $20,50 \pm 1,98 \%$ aufgezeigt. Bedingt durch die generell niedrigeren BP_{ND} -Werte beider Regionen ist die A_1AR -Quantifizierung über die kinetische Modellierung (s. 2.4.5) fehleranfälliger als in den A_1AR -reicheren Regionen. Dieser Sachverhalt wird ausführlich in Kapitel 4.1.1 behandelt.

Tabelle 3.6: Regionenspezifische Unterschiede der p-Werte der Koffein- behandelten Gruppe an Tag 1 des Absetzens von Koffein

Region	Zingulum	Caudatus. Putamen	Hippo- kampus	Thalamus	Hypo- thalamus	Ncl. accumbens	Zerebellum
Kortex	0,484	0,132	0,142	0,039	<0,002*	0,003	0,051
Zingulum		0,037	0,221	0,021	<0,002*	<0,002*	0,050
Caudatus Putamen			0,905	0,076	<0,002*	<0,002*	0,209
Hippo- kampus				0,017	<0,002*	<0,002*	0,263
Thalamus					<0,002*	<0,002*	0,990
Hypo- thalamus						0,009	<0,002*
Ncl. accumbens							<0,002*

Anm.: Signifikante p-Werte wurden über den gepaarten t-Test mit Bonferroni-Holmes-Korrektur ermittelt und mit * gekennzeichnet ($p = < 0,002$).

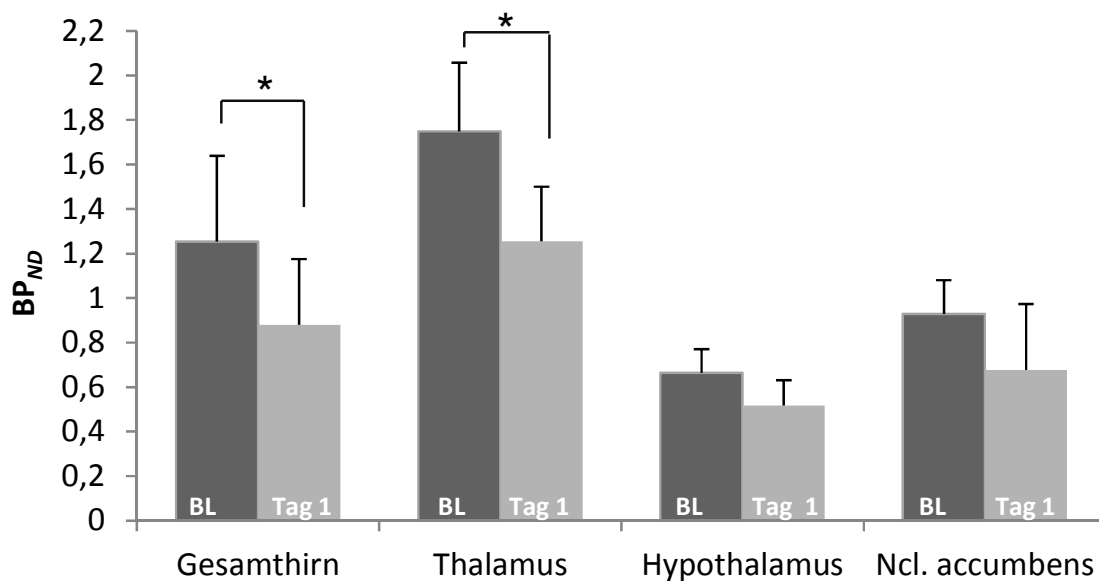


Abb. 3.4: Regionenspezifischen Unterschiede der Koffein-behandelten Gruppe an Tag 1 des Absetzens von Koffein.

Anm.: Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,002$, gepaarter t-Test, Bonferroni-Holmes-Korrektur).

Im weiteren Verlauf und nach einer Koffeinkarenz von ca. 27 Stunden (Tag 2) verschwinden alle regionalen und gruppenspezifischen Effekte und das BP_{ND} pendelt sich um die basalen Werte ein (vgl. Abb. 3.5).

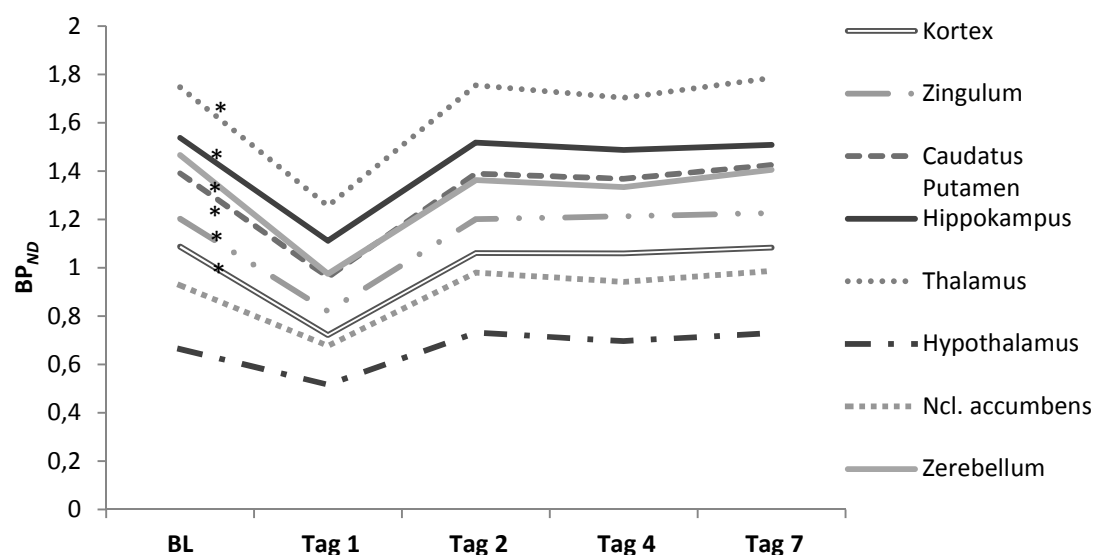


Abb. 3.5: Verlauf der mittleren BP_{ND} -Werte der Koffeingruppe in den untersuchten Regionen.

Anm.: signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet ($p < 0,002$, gepaarter t-Test mit Bonferroni-Holmes-Korrektur)

3.3 Mikrodialytische Analyse der zirkadianen adenosinerger Prozesse sowie von deren koffeinbedingten Veränderungen im ZNS der Ratte

Im folgenden Kapitel werden die zirkadianen sowie koffeinbedingten adenosinerger Prozesse mittels Mikrodialyse untersucht. Zunächst werden die zur Etablierung des experimentellen Set-ups durchgeführten Vorversuche (Stabilität der Adenosinlösungen und Wiederfindungsrate) vorgestellt. Anschließend werden die Ergebnisse der In vivo–Quantifizierung von extrazellulärem Adenosin sowie die zur anatomischen Überprüfung der Lokalisation der Mikrodialysesonden durchgeführten In vitro–Untersuchungen analog zu 2.5.9 dargestellt.

3.3.1 Vorversuche

1. Stabilitätsuntersuchungen

Um methodisch bedingte Konzentrationsschwankungen auszuschließen, wurden Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Stabilität einer 90 nM–Adenosinkonzentration bei Raumtemperatur (RT) bestimmt. Im nächsten Schritt wurde die Stabilität der Proben bei 8 °C, analog zum Autosampler bei der HPLC–Analyse, mit 1, 5, 10 und 250 nM Lösungen untersucht (s. Tabelle 3.7 und Abb. 3.6). Die Stabilitätsuntersuchungen bei 8 °C wurden vom ZEA–3 des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Darüber hinaus wurden die Lagerbedingungen der Proben bis zur Analyse bei -80 °C bzw. -20 °C überprüft. Die Ergebnisse sind Tabelle 3.8 aufgeführt.

Tabelle 3.7: Stabilitätsuntersuchungen verschieden konzentrierter Adenosinlösungen bei Raumtemperatur (RT) und 8 °C

Zeit [h]	Relative Differenz zur Ausgangskonzentration [%]				
	bei Raumtemperatur (RT)		bei 8 °C		
	90 nM	1 nM	5 nM	10 nM	250 nM
2	-9,46	2,11	-5,42		
4	-4,76			-4,89	
5		4,21			
6	-20,15	5,26			-3,05
7		10,53			
8	-9,2		-0,2		
9			-0,6		
10	-23,75			-5,49	
11				-8,38	
12	-32,76	6,32		-9,08	-4,85
14	-29,14		-9,04	-9,68	
16	-36,91	8,42			
18	-43,04		-2	-15,57	-12,8
20	-55,03	4,21			
21	-60,27		-11,85	-21,26	
24	-73,1	-14,74			-14,03
26	-75,29		-27,31	-36,83	
28	-78,04	-32,63			
29			-26,71	-39,92	-16,48
30	-80,45				
32	-83,73	-50,53			
34	-86,5		-61,65	-58,18	
36		-55,79			
37			-64,26	-61,58	
40		-61,05			
41			-69,68	-65,57	
44		-68,42			
45			-75,1	-71,76	
48		-75,79			
49			-76,11	-81,14	

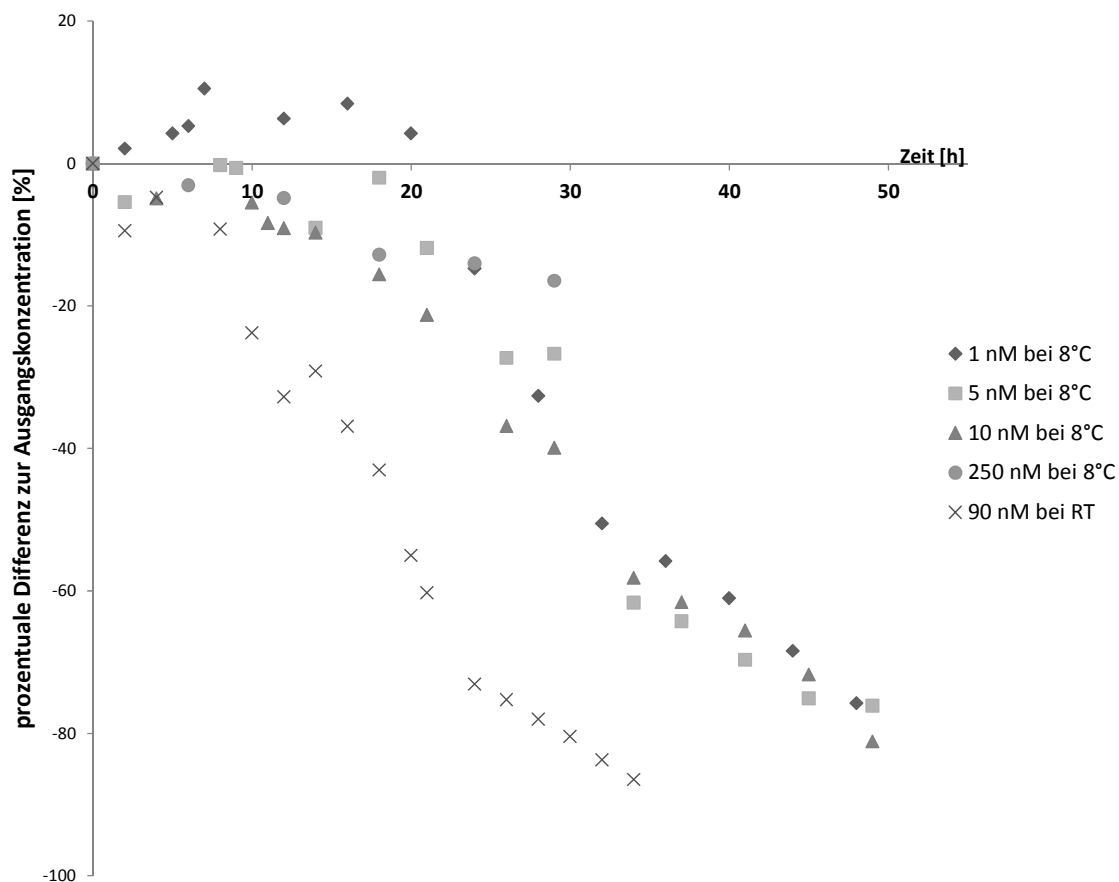


Abb. 3.6: Die temperaturabhängige Stabilität verschieden konzentrierter Adenosinlösungen.

Die Stabilitätsuntersuchungen bei Raumtemperatur ergaben, dass die Adenosinkonzentration bis maximal neun Stunden weitgehend stabil bleibt und um $7,80 \pm 2,64 \%$ abnimmt (s. Tabelle 3.7 und Abb. 3.6). Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Adenosinkonzentration überproportional ab. Die Analyse verschieden konzentrierter Adenosinlösungen bei 8°C zeigt ein analoges Konzentrations–Zeit–Profil. Bei diesem Profil kommt es jedoch zu einer Verschiebung entlang der y–Achse, sodass die Lagerung der Proben bei 8°C über den gesamten Zeitraum stabiler ist. Während bei Raumtemperatur die Adenosinkonzentration bereits ab 10 Stunden um 23 % von der Ausgangskonzentration abweicht, werden konzentrationsunabhängig bei 8°C analoge Werte erst ab 18 bis 20 Stunden erreicht. Folglich kann das Sammelintervall von je zwei Stunden sowie die kurzzeitige Verweildauer der

Proben im Autosampler bis zur Analyse als unproblematisch angesehen werden.

Die Überprüfung der Stabilität der bis zur Analyse (im ZEA-3) gelagerten Proben ergab, dass die Adenosinlösungen über mindestens 4 Wochen sowohl bei -80 °C als auch bei -20 °C unkritisch gelagert werden können (vgl. Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8: Adenosinkonzentration nach 4-wöchiger Lagerung bei -80 °C bzw. -20 °C

Lagerung	$\bar{x} \pm \sigma$ [nM]	Relative Differenz [%]	p-Wert
-80 °C	259,01 \pm 14,40	-3,95	0,30
-20 °C	249,16 \pm 9,89		

Anm.: n = 4; p-Werte wurden über den ungepaarten t-Test ermittelt ($p < 0,05$).

II. Bestimmung der prozentualen Wiederfindungsrate

Wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben, erfolgte die Bestimmung der Wiederfindungsrate nach Formel 2.3 über eine bekannte Adenosinlösung. Angelehnt an die tierexperimentelle Studie fand die Kalibrierung der Sonden bei Raumtemperatur und im analogen Zeitschema statt. Die in I. aufgeführten Stabilitätsuntersuchungen bei Raumtemperatur ergaben eine Abnahme der Ausgangskonzentration um mehr als 10 % bei über neun Stunden, sodass an dieser Stelle nach jeweils 6 bis 8 Stunden eine neue Standard-Adenosinlösung verwendet wurde.

Die relative Wiederfindungsrate von Adenosin in der Mikrodialyse wurde chargenweise an vier Sonden bestimmt und betrug durchschnittlich $7,11 \pm 1,92$ %. Die ermittelten Mittelwerte sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

Tabelle 3.9: Relative Wiederfindungsrate von Adenosin in der Mikrodialyse

Zeit [h]	Relative Wiederfindung [%]
7-stündige Kalibrierung	
0 – 2	5,73 ± 1,71
2 – 4	6,02 ± 2,27
4 – 6	9,51 ± 1,07
6 – 8	6,10 ± 1,10
8 – 10	7,84 ± 1,50
10 – 12	7,95 ± 0,81
12 – 14	7,07 ± 1,52
14 – 16	6,79 ± 1,94
16 – 18	6,46 ± 1,78
18 – 20	6,63 ± 2,74
20 – 22	7,16 ± 2,24
22 – 24	7,80 ± 2,66
$\bar{x} \pm \sigma$	7,11 ± 1,92

In Anlehnung an die tierexperimentelle Studie wurden die Mittelwerte der relativen Wiederfindung in 2 Phasen (*Wach- und Schlafphase*) zusammengefasst. Dabei umfasste die Wachphase die Zeitspanne von 0 bis 12 Stunden nach der 7-stündigen Kalibrierung und die Schlafphase 12 bis 24 Stunden.

Tabelle 3.10: Relative Differenz der Wiederfindungsrate zwischen der Wach- und Schlafphase

Phase (Stunde)	Gepoolter $\bar{x} \pm \sigma$ [nM]	Relative Differenz [%]	p-Wert
0 – 12 (entspr. Wachphase)	7,25 ± 1,88	-3,60	0,756
12 – 24 (entspr. Schlafphase)	6,99 ± 1,99		

Anm.: p-Werte wurden über den gepaarten t-Test ermittelt ($p < 0,05$).

Im Allgemeinen blieb die prozentuale Wiederfindungsrate über den Beobachtungszeitraum (24 Stunden) stabil (vgl. Abb. 3.7). Nach sechs Stunden kam es zwar zu einem Anstieg der Adenosinkonzentration. Dieser unterschied sich jedoch nicht signifikant von dem Gesamtmittelwert ($p > 0,05$, gepaarter t-Test). Im weiteren zeitlichen Verlauf sank die relative Wiederfindungsrate nur minimal um 3,60 % in der Schlafphase ab (s. Tabelle 3.10).

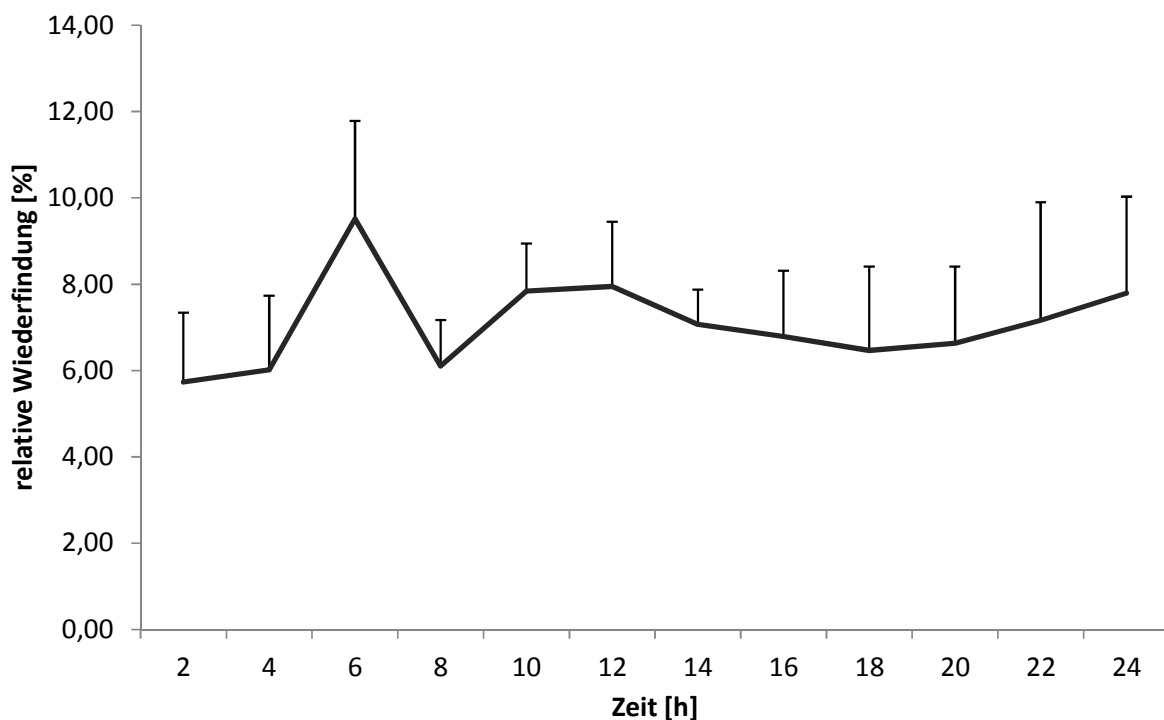


Abb. 3.7: Zeitlicher Verlauf der relativen Wiederfindungsrate in %.

Die statistische Analyse der prozentualen Wiederfindungsrate zwischen der zusammengefassten Wach- und Schlafphase ergab keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tabelle 3.10 und Abb. 3.8). Folglich mussten die tierexperimentellen Daten nicht angepasst werden.

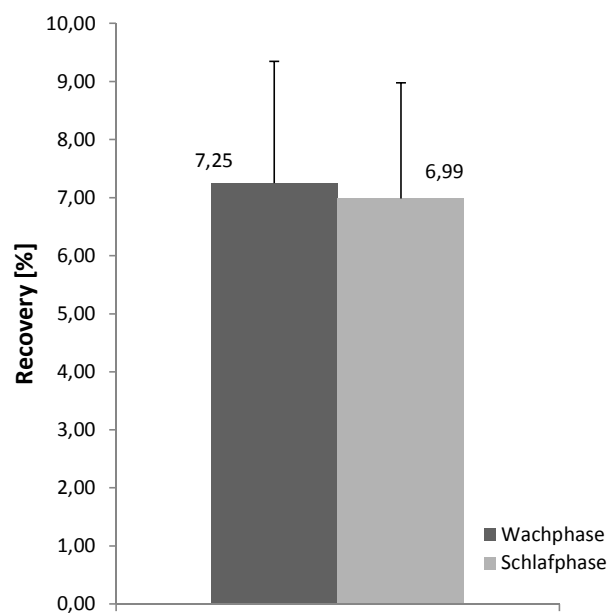


Abb. 3.8: Prozentuale Wiederfindungsrate in der Wach- und Schlafphase

Anm.: p-Werte wurden über den gepaarten t-Test ermittelt ($p < 0,05$).

3.3.2 In vivo–Untersuchungen

In diesem Abschnitt werden die In vivo–Effekte der chronischen Koffeingabe auf die extrazelluläre Adenosinkonzentration mittels Mikrodialyse (vgl. Tabelle 3.11) dargestellt.

Tabelle 3.11: Mittlere Adenosinkonzentration der Koffein- und Kontrollgruppe im Kortex und Thalamus

Zeit [h]	Korrespondierende Phase	Adenosinkonzentration $\pm \bar{x}$ [nM]			
		Kortex		Thalamus	
		Koffein	Kontrolle	Koffein	Kontrolle
7–stündige Kalibrierung					
0 – 2	Wach– bzw. Dunkelphase	15,57 \pm 8,14	2,74 \pm 2,20	14,94 \pm 17,03	5,22 \pm 6,85
2 – 4		13,67 \pm 12,55	2,72 \pm 2,21	11,68 \pm 14,48	5,55 \pm 6,76
4 – 6		7,31 \pm 6,92	2,18 \pm 1,28	9,45 \pm 10,48	4,99 \pm 5,25
6 – 8		7,36 \pm 6,37	1,92 \pm 0,62	7,00 \pm 6,47	4,58 \pm 4,19
8 – 10		6,99 \pm 5,75	2,11 \pm 0,84	8,82 \pm 5,97	5,08 \pm 5,01
10 – 12		8,34 \pm 7,16	1,90 \pm 1,15	8,23 \pm 6,68	3,70 \pm 3,69

Zeit [h]	Korrespondierende Phase	Adenosinkonzentration $\pm \bar{x}$ [nM]			
		Kortex		Thalamus	
		Koffein	Kontrolle	Koffein	Kontrolle
12 – 14	Schlaf- bzw. Hellphase	5,40 \pm 4,65	1,73 \pm 0,95	6,36 \pm 4,03	2,88 \pm 2,81
14 – 16		4,09 \pm 3,97	1,29 \pm 0,60	3,35 \pm 2,70	2,80 \pm 2,06
16 – 18		4,87 \pm 4,22	1,41 \pm 0,92	2,49 \pm 1,77	2,24 \pm 1,85
18 – 20		4,19 \pm 4,48	1,53 \pm 0,50	2,37 \pm 1,16	2,24 \pm 1,88
20 – 22		4,75 \pm 3,73	1,49 \pm 0,63	3,35 \pm 1,97	2,41 \pm 1,72
22 – 24		4,73 \pm 2,83	1,58 \pm 0,92	4,86 \pm 2,76	2,55 \pm 1,72

Die grafische Darstellung der auf die Kontrollgruppe genormten Adenosinkonzentration (vgl. Abb. 3.9) zeigt die durchschnittliche Ligandkonzentration (mit Standardabweichung) über 24 Stunden. Die absolute Differenz zwischen Koffein- und Kontrollgruppe wurde nach Formel 2.5 berechnet.

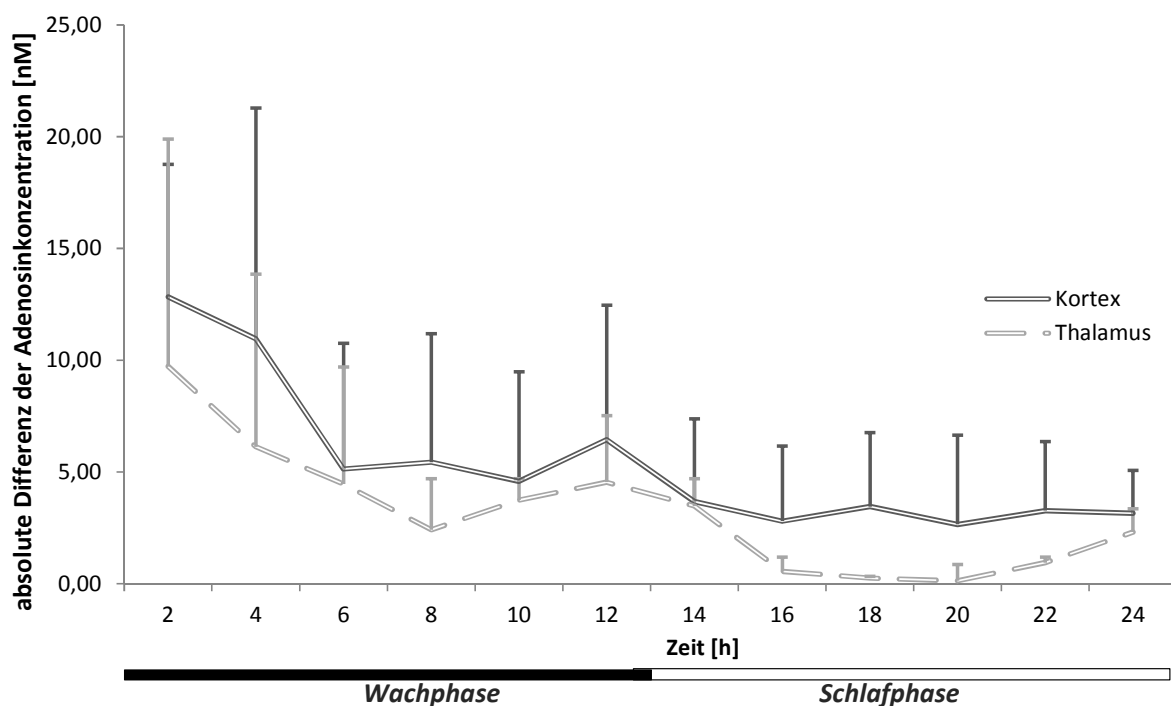


Abb. 3.9: Darstellung der absoluten Differenzen des Adenosinspiegels der Koffein behandelten Gruppe bezogen auf die Kontrollgruppe im Kortex und Thalamus.

Darüber hinaus wurden die gemittelten Adenosinkonzentrationen der jeweiligen Zeiträume in zwei Phasen (*Wach- und Schlafphase*) zusammengefasst. Dabei ist die Wachphase der nachtaktiven Tiere als Zeitspanne zwischen 0 und 12 Stunden (19–7 Uhr, Dunkelphase) nach der 7-stündigen Kalibrierung definiert. Die Schlafphase hingegen umfasst 12 bis 24 Stunden (7–19 Uhr, Hellphase).

Der auf die Kontrollgruppe genormte Adenosinspiegel ist über den gesamten Untersuchungszeitraum im Kortex höher als im Thalamus (s. Abb. 3.9). Während die genormte Adenosinkonzentration im Kortex in der Wachphase um ca. 31 % höher liegt als im Thalamus, erhöht sich die relative Differenz in der Schlafphase auf ca. 60 %. Dies kann auf die höheren Basalwerte im Thalamus zurückgeführt werden (vgl. Tabelle 3.12). Weiterhin kann ein starkes Abfallen der Adenosinkonzentration im Thalamus zum Zeitpunkt des Lichtwechsels (ab Stunde 14) beobachtet werden. Zur generellen Überprüfung des weiteren zeitlichen Verlaufs wurde darüber hinaus vereinzelt der 26-Stundenwert gesammelt. Dieser Wert entspricht dem nächsten Wechsel von Schlaf- zu Wachphase und zeigte das wiederholte, sukzessive Ansteigen der Adenosinwerte. Dieser Befund steht mit den erhöhten Werten in der zuvor bestimmten Wachphase in Einklang.

Tabelle 3.12: Gepoolte mittlere Adenosinkonzentration in der Wach- und Schlafphase

		Gepoolte Adenosin-konzentration [nM]		Absolute Differenz [nM]		Regionen-spezifische Differenz [%]		p-Wert der <u>Intra-individuellen</u> Analyse	Inter-individueller Quotient		p-Wert der <u>Inter-individuellen</u> Analyse	
		Wach-phase	Schlaf-phase	Wach-phase	Schlaf-phase	Wach-phase	Schlaf-phase		Wach-phase	Schlaf-phase	Wach-phase	Schlaf-phase
Kortex	Koffein	9,82 ± 3,80	4,67 ± 0,48	7,56	3,17	31,61	59,62	0,018*	4,35	3,11	0,004*	0,004*
	Kontrolle	2,26 ± 0,38	1,50 ± 0,15					0,128				
Thalamus	Koffein	10,02 ± 2,87	3,80 ± 1,54	5,17	1,28	31,61	59,62	0,018*	2,07	1,5	0,259	0,259
	Kontrolle	4,85 ± 0,65	2,52 ± 0,28					0,043				

Anm.: Intraindividuelle p-Werte wurden mit dem *matched-paired* Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben und die interindividuellen

p-Werte mit dem Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben berechnet. Signifikante Unterschiede wurden *post-hoc* mit der Bonferroni-Methode korrigiert und mit * gekennzeichnet ($p_{\text{intra-}} \& \text{interindividuell} < 0,05/2$).

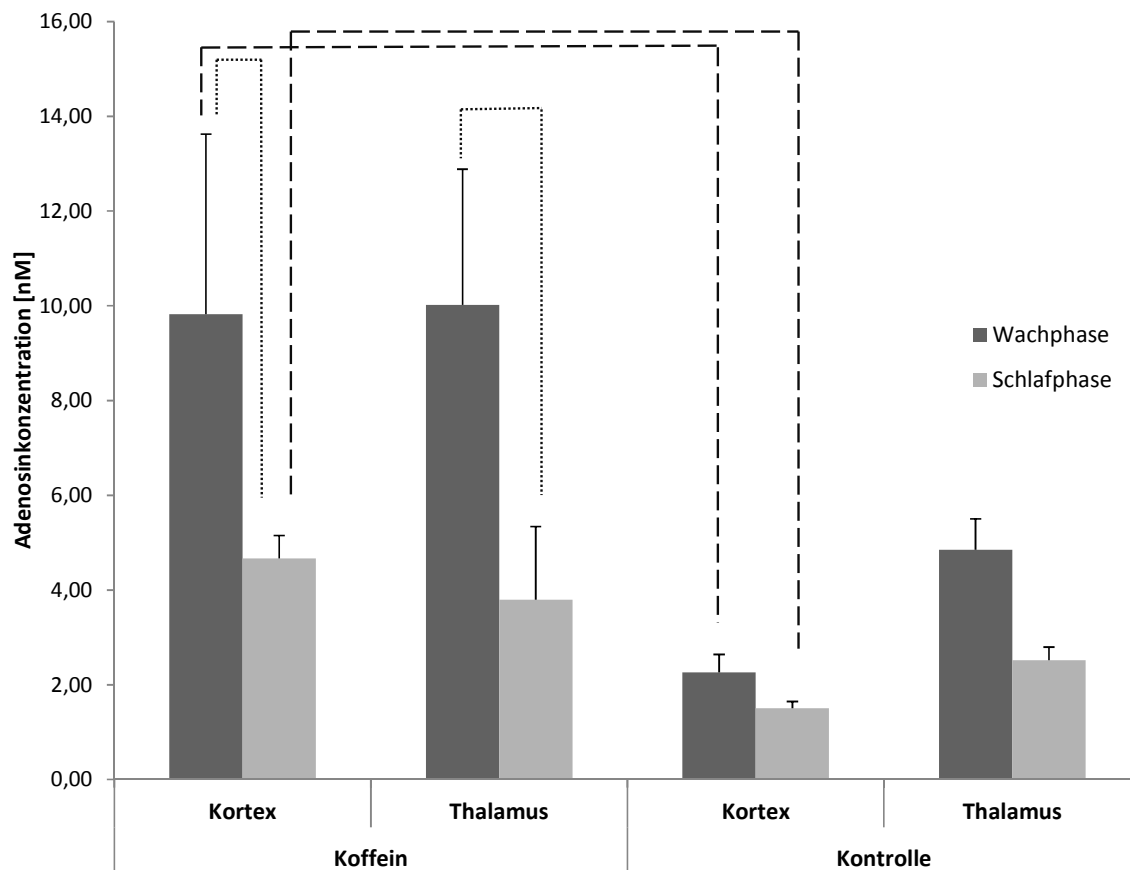


Abb. 3.10: Darstellung der intra- sowie interindividuellen Unterschiede beider Gruppen in Kortex und Thalamus.

Anm.: Signifikante Unterschiede wurden mit Verbindungslinien gekennzeichnet ($p < 0,025$). Intraindividuellen p-Werte wurden mit dem matched-paired Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben und die interindividuellen p-Werte mit dem Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben — - mit anschließender Bonferroni-Korrektur berechnet.

Im Allgemeinen konnte intraindividuell innerhalb der Kontrollgruppe im Kortex zwischen der zusammengefassten (gepoolten) Wach- und Schlafphase keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (vgl. Tabelle 3.12 und Abb. 3.10). Hingegen im Thalamus konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p < 0,05$), die jedoch der anschließenden Bonferroni-Korrektur nicht standhielten. Die chronische Gabe von 30 mg/kg KG/d Koffein führte in beiden Regionen zu einem signifikant erhöhten Adenosinspiegel zwischen beiden Phasen (*Matched-Paired* Wilcoxon-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur, $p < 0,025$). Die interindividuelle Analyse der Koffein-

und Kontrollgruppe ergab ausschließlich im Kortex einen signifikanten Unterschied in beiden Phasen (Tabelle 3.12, Mann–Whitney–U–Test mit anschließender Bonferroni–Korrektur, $p < 0,025$). Während die gepoolte kortikale Adenosinkonzentration in der Schlafphase der Koffeingruppe um das Dreifache höher liegt als in der Kontrollgruppe, führte die chronische Koffeinapplikation in der Wachphase zu einem vierfach höheren Adenosinspiegel. Im Thalamus dagegen konnte interindividuell, trotz erhöhter Adenosinkonzentration, keine signifikanten Unterschiede verglichen zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Der interindividuelle Quotient betrug dabei 1,5 in der Schlaf– bzw. 2 in der Wachphase. Weiterhin gilt, dass je höher der vorausgegangene Adenosinspiegel ist, desto höher ist auch die verbleibende Konzentration in der Adenosin–abbauenden Schlafphase (Spearman–Korrelation, $p < 0,01$).

3.3.3 In vitro–Untersuchungen

Die anatomische Überprüfung der Lokalisation der Mikrodialysesonden innerhalb des FC und Thalamus ist in Abb. 3.11 dargestellt. Auf koronaler Ebene wurden die Koordinaten +3,2 mm anteroposterior (AP) und +3,5 mm mediolateral (ML) für den Kortex, sowie -3,0 mm AP und +3,0 mm ML für den Thalamus angestrebt. Auf der linken Seite sind schematisch die Zielregionen nach Paxinos und Watson (1998) dargestellt. Hierbei stellt die gestrichelte Linie die 2 mm lange Membran dar. Auf der rechten Seite der Abbildung ist beispielhaft ein reeller, nach 2.5.9 gefärbter Schnitt dargestellt. Die eindeutige Identifizierung der Lokalisation der Mikrodialysesonden ist aufgrund der veränderten Zellstruktur im gefärbten Hirnschnitt möglich. Um die Qualität der Befunde und die Aussagekraft der Untersuchungen zu maximieren, wurden in dieser Studie ausschließlich Daten von Tieren verwendet, bei denen die

postmortale In vitro–Analyse der Sondenlage zeigte, dass die Sonde präzise im Zielareal lokalisiert war.

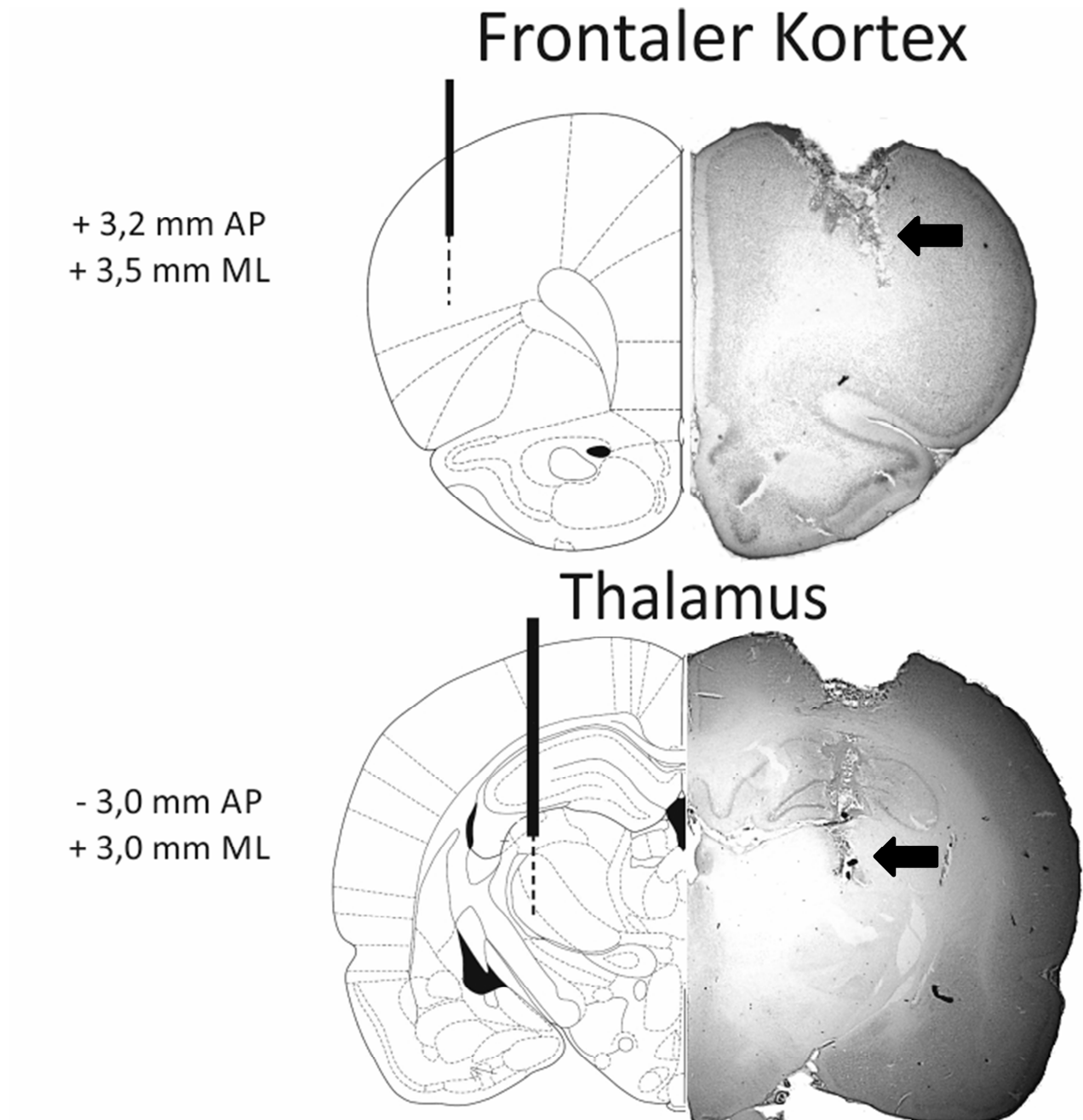


Abb. 3.11: Darstellung des Stichkanals der Führungskanülen. *Links* Planungsvorgabe; *Rechts* exemplarischer, gefärbter Rattenhirnschnitt mit Verlaufsdarstellung des Stichkanals.

4 Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Ergebnisse einzeln und methodenabhängig diskutiert. Anschließend werden die Ergebnisse im Hinblick auf die potentiell neuroprotektive Wirkung des Koffeins methodenübergreifend beleuchtet und Hypothesen unter Einbezug der beschriebenen Ergebnisse formuliert. Daran schließt sich die Diskussion über die verwendeten Methoden, einschließlich der Frage der Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen an.

4.1 Diskussion der experimentellen Befunde

4.1.1 In vivo–Quantifizierung der zerebralen A₁AR

In dieser Untersuchung wurden die Veränderungen der zerebralen A₁AR–Dichte nach chronischer Koffeinapplikation mittels nicht–invasiver PET ermittelt. In der Kontrollgruppe zeigten sich über den gesamten Verlauf der Studie stabile zerebrale Werte für den A₁AR. Für Ratten war bereits zuvor eine altersabhängige Abnahme des A₁AR nach 84 Wochen berichtet worden (Meerlo *et al.*, 2004). Der vergleichsweise kurze Beobachtungszeitraum der vorliegenden Studie von ca. 13 Wochen bildet diese sehr langfristigen Änderungen jedoch nicht ab. Altersbedingte, molekulare Veränderungen des A₁AR sind daher innerhalb des Untersuchungszeitraums unwahrscheinlich, obwohl der hier untersuchte Zeitraum nach Sengupta (2013) immerhin ca. 9 Lebensjahren beim Menschen entsprechen würde.

Die koffeinbehandelten Tiere weisen im Gegensatz zu den Kontrolltieren an Tag 1 nach dem Absetzen des Koffeins (nach ca. 4 h, 2. PET–Scan) deutlich herabgesetzte BP_{ND}–Werte (bzw. eine geringere [¹⁸F]CPFPX–Bindung) auf (vgl. Abb. 3.2). Dies könnte einerseits Zeichen einer chronischen koffeinbedingten Veränderung der Expressionsrate des A₁AR sein. Andererseits

ist jedoch auch zu prüfen, ob die verminderte [^{18}F]CPFPX-Bindung auf eine noch vorhandene Blockade des A₁AR durch biologisch langlebige Metabolite des Koffeins zurückzuführen ist. Dafür sprechen frühere Ergebnisse von Meyer *et al.* (2003) aus unserem Institut. Der sichere Nachweis solcher Metabolite wäre nur in Blutproben möglich. Dies hätte jedoch eine Verweilkanüle in einer Arterie, z. B. der A. femoralis, erfordert. Zum Schutz der durch die Experimente bereits belasteten Tiere sowie aufgrund der Empfehlungen der GV-SOLAS wurde jedoch auf venöse Verweilkanülen bei den mehrtägigen Longitudinalmessungen verzichtet.

Allerdings stehen Befunde innerhalb dieser Studie zur Verfügung, bei denen zu einem früheren Zeitpunkt an anderen Tieren der Koffein-Plasmaspiegel bestimmt wurde. Dieser betrug am Ende der Aktivphase (7 Uhr) $7,29 \pm 1,41 \mu\text{g/mL}$, was in Einklang mit den chronischen Koffeinstudien von Zielke und Zielke (1987) und Kaplan *et al.* (1993) steht. Um mit der PET die A₁AR-Dichte vollständig visualisieren zu können und folglich die Radioligandbindung am Rezeptor nicht durch Koffein zu blockieren, wurde das Koffein zwei Stunden später abgesetzt (9 Uhr) und nach weiteren vier Stunden die zweite PET-Messung durchgeführt. Da Ratten als nachaktive Tiere in die Kategorie der polyphasischen Schläfer mit mehreren langen und über den ganzen Tag verteilten Schlafepisoden fallen (Tobler, 1989), ist ein koffeinfreies Intervall von 4 bis 6 Stunden bis zum zweiten PET-Scan erforderlich. Zur weiteren Abschätzung des Plasmaspiegels zum Zeitpunkt der zweiten Messung muss die biologische Plasma-Halbwertszeit berücksichtigt werden. Wie in 1.3.1 aufgeführt, variiert diese in Ratten dosisabhängig. Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) beträgt bei einer Dosis von 5 mg/kg KG ca. eine Stunde (Bonati *et al.*, 1982; Bortolotti *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 2013; Noh *et al.*, 2015) und ab einer Dosis von 10 mg/kg KG zwei bis vier Stunden (Bortolotti *et al.*, 1990; Wang und Lau, 1998; Liu *et al.*, 2005). Da unter chronischer Koffeingabe bisher keine

Halbwertszeiten bestimmt wurden, wird der Plasmaspiegel unter Berücksichtigung verschiedener Halbwertszeiten nach Formel 4.1 abgeschätzt. Eine potentiell verkürzte Halbwertszeit aufgrund einer koffeinbedingten CYP-Induktion durch die chronische Gabe bleibt an dieser Stelle unberücksichtigt.

Formel 4.1:

$$\begin{aligned} & \text{Berechneter Plasmaspiegel zum Zeitpunkt v. Scan 2 } [\mu\text{M}] \\ &= \text{Plasmaspiegel } [\mu\text{M}] \times e^{-\ln 2 \times \frac{\text{koffeinfreies Intervall [h]}{\text{angenommene Halbwertszeit [h]}}} \end{aligned}$$

Wie bereits in 1.3.1 aufgeführt, kann der Koffein-Plasmaspiegel als Surrogatmarker für die ungebundene, freie Fraktion im Gehirn angesehen werden (Liu *et al.*, 2006). Folglich kann anschließend mithilfe des IC_{50} -Wertes (100 μM , vgl. Abb. 4.1) die zum Zeitpunkt von Scan 2 äquivalente Rezeptorblockade abgeschätzt werden. Dabei wird der IC_{50} -Wert als Konzentration definiert, bei der 50 % der Ligandbindung durch den Antagonisten inhibiert werden (Aktorius *et al.*, 2009).

Die spezifische Bindung von Koffein und seiner Metabolite wurde aus der prozentualen Inhibitionsrate der [^3H]-Cyclohexyladenosin-Bindungsstudie von Daly *et al.* (1983) bestimmt, gemäß Formel 4.2 modifiziert und in Abb. 4.1 dargestellt :

Formel 4.2:

$$\begin{aligned} & \text{Spezifische Bindung } [\%] \\ &= 100 \% - (\text{spezifische Radioligandbindung aus Daly et al., 1986}) \end{aligned}$$

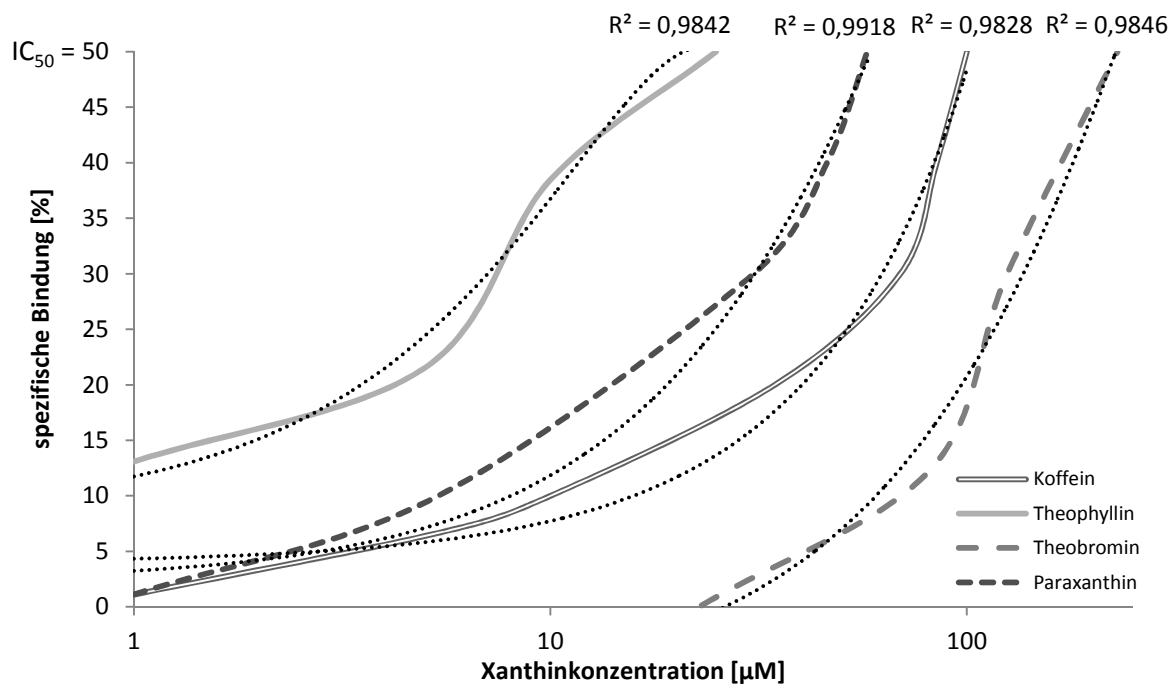


Abb. 4.1: Die spezifische Bindung verschiedener Xanthine nach Daly *et al.* (1983) mit jeweiliger polynomischer Trendlinie und dem dazugehörigen Bestimmungsmaß R^2 .

Für die nachfolgenden Abschätzungen der prozentualen Rezeptorblockade wurde die jeweilige von Microsoft® Excel® (2010, Microsoft Corporation, Redmont, USA) generierte, polynomische Formel der Trendlinien verwendet. Die in Abhängigkeit von Halbwertszeit und koffeinfreiem Intervall ermittelten Plasmaspiegel sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1: Berechneter Plasmaspiegel sowie abgeschätzte Rezeptorblockade zum Zeitpunkt der zweiten PET-Messung unter Berücksichtigung verschiedener Halbwertszeiten

Ausgangs- plasmaspiegel von Koffein	Koffein- freies Intervall [h]	angenommene Halbwertszeit [h]	Berechneter Plasmaspiegel zum Zeitpunkt v. Scan 2 [µM]	Abgeschätzte Rezeptor- blockade [%]
7,29 µg/mL (37,54 µM)	6	1	0,59	4,18
		2	4,69	5,71
		4	13,27	8,99
	4	1	2,34	4,83
		2	9,38	7,49
		4	18,77	11,14

Nach Tabelle 4.1 beträgt der maximal berechnete Plasmaspiegel 18,77 μM (mit $t_{1/2} = 4 \text{ h}$), was einer Rezeptorblockade von ca. 11 % entspricht. Nach Fredholm *et al.* (1999) antagonisiert Koffein den endogenen Liganden Adenosin bereits ab 10 μM . Jedoch können nach Elmenhorst *et al.* (2011) Rezeptorblockaden unter 10 % bei In vivo-Messungen nicht zuverlässig detektiert werden. Folglich ist die reduzierte [^{18}F]CPFPX-Bindung zum Zeitpunkt des zweiten PET-Scans unter Berücksichtigung von Halbwertszeit und koffeinfreiem Intervall nicht oder nur zu einem geringen Anteil auf noch vorhandenes unverstoffwechseltes Koffein zurückzuführen.

Die geringere [^{18}F]CPFPX-Bindung und die potentielle Blockade des $A_1\text{AR}$ können jedoch auch durch die Metabolite des Koffeins verursacht worden sein. Wie in 1.3.1 aufgeführt, treten im Stoffwechsel von Nagern ebenfalls die pharmakologisch aktiven Metabolite Theophyllin, Paraxanthin und Theobromin auf. Theophyllin und Paraxanthin stellen hochpotente $A_1\text{AR}$ -Antagonisten dar. Die IC_{50} -Werte für Theophyllin liegen bei 20 – 30 μM bzw. für Paraxanthin bei 40 – 65 μM (s. Abb. 4.1) und somit niedriger als der Wert von Koffein (Daly *et al.*, 1983). In dieser Studie kann Theobromin mit einem IC_{50} -Wert von 210 – 280 μM als alleiniger Kandidat für die langanhaltende Rezeptorblockade ausgeschlossen werden, da durch die Gabe von 30 mg/kg KG reinen Koffeins keine pharmakologisch relevanten Theobromin-Plasmaspiegel erreicht werden (vgl. Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Berechnete Plasmaspiegel der Hauptmetabolite von Koffein zum Zeitpunkt des zweiten PET-Scans

Metabolit	berechneter Ausgangsplasmaspiegel [µg/mL]	Koffeinfreie Zeit [h]	angenommene Halbwertszeit [h] (Choi <i>et al.</i> , 2013)	Berechnete Plasma-Konzentration zum Zeitpunkt von Scan 2 [µM]
Koffein	7,29	vgl. Tabelle 4.1		
Theophyllin	11,21	6	3	15,55
		4		24,67
Theobromin	21,24	4	3	29,47
		6		46,78
Paraxanthin	9,05	6	1,8	4,98
		4		10,76

Anm.: *kursive* Werte sind nach dem Verhältnis von Gasior *et al.*, 2002 abgeschätzt worden.

Aus technischen Gründen konnten die Metabolitkonzentrationen nicht im gleichen Ansatz wie der Koffeinspiegel bestimmt werden. Nach der Veröffentlichung von Gasior *et al.* (2002), bei der ebenfalls analoge Koffeindosen über 12 Wochen appliziert wurden, beträgt das Verhältnis von Koffein zu Theophyllin zu Theobromin und Paraxanthin im Plasma 1 zu 1,5 zu 3 zu 1,25. Die hierzu ermittelten Plasmaspiegel sind in Tabelle 4.2 aufgeführt und wurden analog zu Tabelle 4.1 anhand von Formel 4.1 und Formel 4.2 berechnet.

Da die Plasmakonzentration der Metabolite im Gegensatz zu Koffein nicht äquivalent zur Konzentration in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) ist, müssen an dieser Stelle die Werte um 0,7 für Theophyllin und um 1,3 für Theobromin korrigiert werden (Liu *et al.*, 2006). Für Paraxanthin ist bisher kein Korrekturfaktor in der Ratte bekannt.

Tabelle 4.3: Metaboliten–Plasmaspiegel unter Einbezug eines Zerebrospinal–/Plasma–Korrekturfaktors

Metabolit	Berechnete Konzentration zum Zeitpunkt von Scan 2 [μM]	geschätzte Rezeptor–blockade [%]	Korrekturfaktor CSF/Cplasma (Liu <i>et al.</i> , 2006)	Korrigierte, berechnete Konzentration zum Zeitpunkt von Scan 2 [μM]	Korrigierte, geschätzte Rezeptor–blockade [%]
Theophyllin	15,55	45,83	0,70	<i>10,88</i>	38,52
	24,67	50,25		<i>17,28</i>	47,67
Theobromin	29,47	0,94	1,3	<i>38,31</i>	3,54
	46,78	5,99		<i>60,81</i>	9,94
Paraxanthin	4,98	7,10	unbekannt		
	10,76	12,54			

Anm.: kursive Werte sind nach Liu *et al.* (2006) korrigiert worden.

Während Paraxanthin in Abhängigkeit vom koffeinfreien Intervall eine 5 bis 11 %ige Rezeptorblockade aufweist, blockiert Theobromin maximal 10 % (vgl. Tabelle 4.3). Da jedoch für Paraxanthin bisher kein Korrekturfaktor zwischen Zerebrospinalflüssigkeit und Plasma generiert wurde, können diese Werte ebenfalls höher ausfallen. Der maximale Plasmaspiegel von Theophyllin bei einem 6–stündigen, koffeinfreien Intervall beläuft sich auf 10,88 μM (korrigiert), was einer Rezeptorblockade von ca. 38 % entspricht. Die an Tag 1 nach Absetzen des Koffeins (zweiter PET–Scan) beobachtbare Abnahme der [^{18}F]CPFPX–Bindung betrug $34 \pm 2\%$ (s. 3.2). Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass die reduzierte [^{18}F]CPFPX–Bindung bzw. das verminderte Bindungspotenzial zum Zeitpunkt des zweiten Scans eine Blockade des A₁AR durch verschiedene Koffeinmetabolite widerspiegelt. Zwar mussten für die aufgeführten Berechnungen einige Annahmen (z. B. Halbwertszeit, Verhältnis Metabolite zu Koffein) zugrunde gelegt werden, jedoch dienen diese nur als Näherungswerte zur Abschätzung des Xanthin–Restplasmaspiegels.

Frühere Studien haben gezeigt, dass zum einen in geringem Ausmaße aus Theophyllin erneut Koffein gebildet werden kann (Tang–Liu und Riegelman, 1981) und zum anderen zeitverzögert der Metabolitenspiegel mit der Abnahme

des Koffeinspiegels ansteigt (Song *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; Wang und Lau, 1998). Diese subtilen Effekte wurden in die Berechnungen nicht mit einbezogen.

Wie in 1.3.3 aufgeführt, konnten in der Vergangenheit keine einheitlichen Effekte einer chronischen Koffeinapplikation auf den A₁AR beobachtet werden. In einigen In vitro–Studien konnte proportional zur Dosis eine Aufregulierung des A₁AR beobachtet werden (Chou *et al.*, 1985; Boulenger *et al.*, 1983; Fredholm, 1982). Im Gegensatz dazu konnte jedoch auch dosisunabhängig in weiteren In vitro–Studien keine molekularspezifischen Veränderungen des A₁AR in Folge chronischer Koffeinapplikation gefunden werden (Espinosa *et al.*, 2013; Johansson *et al.*, 1996; Georgiev *et al.*, 1993; Traversa *et al.*, 1994; Zielke und Zielke, 1987).

In der vorliegenden Studie wurden 30 mg/kg KG/d Koffein oral appliziert, was einem gebräuchlichen menschlichen Kaffeekonsum von 4 – 5 Tassen Kaffee/d entspricht (vgl. 2.2). Da bisher ausschließlich Befunde von In vitro–Studien vorliegen, stellt die vorliegende In vivo–Studie zum ersten Mal die komplexen regulatorischen Prozesse in Rechnung, welche beim Kaffeekonsum im lebenden Organismus stattfinden. In diesem Kontext spiegelt vor allem der zweite PET–Scan aufgrund des pharmakologisch aktiven Rest–Xanthinspiegels den realen In vivo–Zustand des A₁AR nach chronischer Koffeingabe wider. Durch den Rest–Xanthinspiegel und die damit verbundene Konkurrenz mit dem verwendeten Radioliganden könnten jedoch auch die molekularspezifischen Veränderungen des A₁AR, also eine potentielle Aufregulation, maskiert worden sein.

Alle späteren Messungen (Tag 2 bis Tag 7) wichen nicht von den BP_{ND}–Werten der Kontrollgruppe ab. Folglich scheinen alle durch die mehrwöchige chronische Koffeineinnahme bedingten Veränderungen bereits 27 Stunden

kompensiert worden zu sein. Dabei ist davon auszugehen, dass zu den späteren Zeitpunkten bereits der verbliebene Rest-Xanthinspiegel vollständig ausgewaschen wurde. Die verbliebene, abgeschätzte und korrigierte Rezeptorblockade von Koffein und seiner Metabolite beträgt dabei $< 0,25\%$. Diese Daten stehen in Widerspruch zu den In vitro-Erkenntnissen von Boulenger und Marangos (1989), bei denen die koffeinbedingten Effekte (aufregulierte A_1AR -Dichte) bis einschließlich Tag 4 nach Absetzen des Koffeins bestehen blieben. Nach Wu und Coffin (1984) ist die erhöhte A_1AR -Dichte sogar noch 30 Tage später zu beobachten. Hingegen nach Holtzman *et al.* (1991) und Kaplan *et al.* (1993) sind keinerlei molekularspezifischen Veränderungen des A_1AR über das Absetzen des Koffeins hinaus zu erwarten. Es kann daher angenommen werden, dass in der vorliegenden In vivo-PET-Studie zum Zeitpunkt des zweiten PET-Scans keine Aufregulation sondern das basale Bindungspotenzial des A_1AR durch die Blockade maskiert wurden. Diese Befunde stehen damit ebenfalls in Einklang mit den In vitro-Studien, die bei experimentell-therapeutisch dosiertem Koffein ($< 50\text{ mg/kg KG/d}$) keine Aufregulation beobachten konnten (Johansson *et al.*, 1996; Traversa *et al.*, 1994; Green und Stiles, 1986).

Neben der potentiellen Blockade des A_1AR zum Zeitpunkt des zweiten PET-Scans konnten darüber hinaus regionenspezifische Unterschiede innerhalb der Koffeingruppe aufgezeigt werden. Dabei zeigten Hypothalamus und Ncl. accumbens zwar signifikante Unterschiede verglichen zur Kontrollgruppe, jedoch wichen diese Areale intraindividuell signifikant von den übrigen Regionen ab. Möglicherweise stellen diese beiden, verglichen mit den restlichen Regionen, koffeininsensitive Areale dar, bei denen eine chronische Koffeinapplikation eine verringerte A_1AR -Blockade oder eine schnellere Freigabe der Rezeptoren nach Koffeinentzug auslöst. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass in früheren Studien ebenfalls regionenspezifisch ein

unterschiedliches Ansprechen des A₁AR auf eine chronische Koffeinapplikation beobachtet werden konnte (Hawkins *et al.*, 1988; Marangos *et al.*, 1984; Wu und Coffin, 1984). Hierbei sprachen vorwiegend A₁AR-reiche Areale wie z.B. der Kortex und Thalamus an. Weiterhin kann die fehlende Signifikanz auf eine geringere statistische Aussagekraft bzw. ungenauere A₁AR-Quantifizierung als in den A₁AR-reicheren Regionen zurückgeführt werden, da es sich bei Hypothalamus und Ncl. accumbens um kleinere Regionen mit sehr niedrigen BP_{ND}-Werten handelt. Dieser Fehler würde sich jedoch durch eine an die spezifischen Verhältnisse dieser Regionen angepasste Stichprobengröße beseitigen lassen. Besonders starke BP_{ND}-Signale und demnach hohe A₁AR-Dichten wurden in dieser Studie, wie bereits von Kroll *et al.* (2014) beschrieben, in Thalamus, Caudatus Putamen, Hippokampus und Zerebellum gefunden.

4.1.2 In vivo-Quantifizierung von extrazellulärem Adenosin

Während mittels PET die koffeinbedingten, adenosinergen Veränderungen auf die Rezeptor-, also postsynaptische Ebene dargestellt werden können, gestattet es die Mikrodialyse, die Auswirkungen der chronischen Koffeingabe auf die präsynaptische Freisetzung von Adenosin zu beobachten.

Wie bereits erwähnt, stellen Ratten als nachtaktive Tiere polyphasische Schläfer dar. Um die unterschiedlich langen und über den ganzen Tag verteilten Schlafepisoden einheitlich über alle Versuchsgruppen abbilden zu können, wurde die Adenosinkonzentration der einzelnen Zeiträume jeweils in Wach- bzw. Schlafphasen zusammengefasst. Da eine zusätzliche Implantation von EEG-Sonden nicht möglich war, wird bei der Analyse der Schlafphasen keine weitere Differenzierung zwischen NREM- und REM-Phasen vorgenommen.

Wie bereits in 1.2.4 dargelegt, stellt Adenosin eine wichtige endogene, den Schlaf fördernde Substanz dar. In zahlreichen Publikationen konnte der

zirkadiane Verlauf von Adenosin in Ratten (Chagoya de Sanchez *et al.*, 1993; Huston *et al.*, 1996) und Menschen (Zeitzer *et al.*, 2006) aufgezeigt werden. Dabei beträgt die physiologische Adenosinkonzentration nach Daly und Fredholm (1998) 30 bis 300 nM. Unter Einbezug der In vitro–Wiederfindungsrate konnten in der Kontrollgruppe analoge Werte aufgezeigt werden (s. Tabelle 4.4), wobei im Thalamus grundsätzlich höhere basale Adenosinkonzentrationen vorliegen.

Tabelle 4.4: Basale Adenosinwerte in Kortex und Thalamus

		Adenosin– konzentration im Dialysat [nM]	Wiederfindungsrate [%]	Korrigierte Adenosin– konzentration [nM]
Wachphase	Kortex	2,26 ± 0,38	7,25	31,19
	Thalamus	4,85 ± 0,65		66,94
Schlafphase	Kortex	1,50 ± 0,15	6,99	21,53
	Thalamus	2,52 ± 0,28		36,03

Adenosin steigt in der Wachphase kontinuierlich an und trägt damit zu einem molekularen Prozess bei, der den Schlafdruck erhöht und die Schlafphase, in der es sukzessiv wieder abgebaut wird, induziert. In dieser Studie konnte bei der Kontrollgruppe innerhalb der Wachphase leichtgradig erhöhte Adenosinwerte gefunden werden, die allerdings nicht signifikant von der Schlafphase abweichen (vgl. Tabelle 3.12). Dies könnte auf die sehr niedrigen Werte, die nahe der analytischen Bestimmungsgrenze liegen, zurückzuführen sein. Ferner sind bei der Mikrodialyse aufgrund der individuell verschiedenen Basalwerte, grundsätzlich hohe Standardabweichungen vorzufinden. Wegen dieser intraindividuell abweichenden Basalwerte müssen bei der Untersuchung von zirkadianen Effekten essentiell gleichbleibende Umgebungsparameter sichergestellt werden. In dieser Studie konnten konstante Licht– und Temperaturverhältnisse mithilfe einer eigens zu diesem Zweck entwickelten

und gebauten Mikrodialysebox (2.5.7) gewährleisten werden. Neben dem gleichbleibenden Versuchsaufbau in beiden untersuchten Gruppen wurden auch weitere Parameter, wie etwa der Zeitpunkt der mikrodialytischen Ableitung (inklusive vorheriger 7 stündiger Kalibrierzeit) stets zur gleichen Tageszeit durchgeführt. Folglich ist davon auszugehen, dass die Befunde in der Kontrollgruppe sehr valide sind.

Bei chronischer Koffeinapplikation wurde bereits von höheren Adenosinkonzentrationen berichtet. In der Studie von Conlay *et al.* (1997) konnte aufgezeigt werden, dass sich der Adenosin–Plasmaspiegel bei einer Gabe von 65 mg/kg KG/d Koffein um das Zehnfache erhöht. Da Adenosin jedoch die Bluthirnschranke nicht durchdringen kann (Isakovic *et al.*, 2004), bestand die Möglichkeit, dass diese Effekte auf die Peripherie beschränkt sind. Aus diesem Grund war die Untersuchung der extrazellulären, zerebralen Adenosinkonzentration von übergeordnetem Interesse. In dieser Studie stieg die intrazerebrale Adenosinkonzentration phasenunabhängig im Kortex um ca. das Vierfache und im Thalamus um ca. das Doppelte der Kontrollkonzentration an.

Während im Kortex innerhalb der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen Wach– und Schlafphase zuerkennen waren, konnten im Thalamus zwar signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p < 0,05$). Diese hielten jedoch der anschließenden Bonferroni–Korrektur nicht stand. Die chronische Koffeinapplikation von 30 mg/kg KG/d hingegen ließ die Adenosinkonzentration in beiden Phasen sowohl im Kortex als auch im Thalamus ansteigen. Darüber hinaus zeigte sich, dass je höher der vorausgegangene Adenosinspiegel und die damit verbundene Schlafneigung waren, desto höher war auch die verbleibende Konzentration in der Adenosin–abbauenden Schlafphase. Der interindividuelle Vergleich zur Kontrollgruppe

ergab ausschließlich im Kortex in beiden Phasen signifikante Unterschiede (vgl. Tabelle 3.12). Trotz des erhöhten Adenosinspiegels und der zahlreichen reziproken Projektionsneuronen zwischen Kortex und Thalamus (vgl. 1.1.1) konnte im Thalamus kein signifikanter Unterschied bezogen auf die Kontrollgruppe festgestellt werden. Möglicherweise variiert die koffeinbedingte Ansprechrate der Adenosinfreisetzung in den unterschiedlichen Regionen. In Bezug auf SD konnte bereits gezeigt werden, dass zwar das BF und der FC erhöhte Adenosinkonzentrationen aufweisen, das Zingulum jedoch unverändert bleibt (Kalinchuk *et al.*, 2011). Weiterhin zeigten sich im Thalamus von Katzen nach drei Stunden SD keine Änderungen der Adenosinwerte, während im FC bereits ein Anstieg des Adenosins um ca. 30 % gegenüber dem physiologischen Pegel zu beobachten war (Porkka-Heiskanen *et al.*, 2000).

Neben der geringeren Ansprechrate des Thalamus auf Koffein, kann die fehlende Signifikanz möglicherweise auch auf eine bessere Adaption auf die chronische Applikation zurückzuführen sein. Dabei verändert die Koffeinapplikation zunächst den physiologischen Rhythmus, nähert sich jedoch nach langfristiger Gabe dem physiologischen Spiegel an. Dagegen spricht jedoch der grundsätzlich erhöhte Adenosinspiegel. Die relative Differenz zwischen der Kontroll- und der Koffeingruppe betrug ca. 52 % in der Wachphase und ca. 34 % in der Schlafphase. Inwiefern methodische Aspekte das Ergebnis beeinflusst haben könnten, soll in Kapitel 4.3.3 ausführlicher besprochen werden.

Im Allgemeinen kompensiert der hervorgerufene Anstieg der zellulären Adenosinkonzentration, wie von da Silva *et al.*, 2003 beschrieben, die antagonistische Wirkung von Koffein auf der Rezeptorebene. Entsprechend dem Massenwirkungsgesetz wird der kompetitive Antagonist Koffein durch die

höhere Agonistenkonzentration vom Rezeptor wieder verdrängt. Dieser Effekt gewährleistet die Wiederherstellung der homöostatischen Bedingungen auf der Rezeptorebene.

Darüber hinaus imitiert die koffeinbedingte, erhöhte Adenosinkonzentration den Effekt anhaltender Wachheit. Interessanterweise werden analoge Reaktionen bei verlängerten Wachphasen, wie z.B. unter SD, hervorgerufen (Kalinchuk *et al.*, 2011). Wie bereits in 1.3.3 beschrieben, wird Adenosin durch Koffein reversibel antagonisiert. Dadurch wird die Müdigkeit vermindert und die kognitive Leistungsfähigkeit vorübergehend gesteigert. Als Folge des kompetitiven Antagonismus wird, wie zuvor erläutert, der Adenosinspiegel indirekt über das Massenwirkungsgesetz erhöht. Im Gegensatz dazu wird bei SD ein erhöhter Adenosinspiegel direkt induziert, da auf diese Weise der resultierende homöostatische Schlafdruck erhöht wird, um den notwendigen Erholungsschlaf auszulösen.

Die koffeininduzierte anhaltende Wachheit und der damit assoziierte erhöhte Schlafdruck unterstützen die Hypothese, dass es nach chronischem Koffeinkonsum zu Gewöhnungseffekten kommt. Dabei lässt bei gleichbleibender Dosis die Wirkung nach. Beispielsweise gibt es, wie bereits in 1.3.3 aufgeführt, bei Langzeit-Kaffeetrinkern keine signifikanten Veränderungen des Schlafrhythmus (Colton *et al.*, 1968). Des Weiteren werden bereits nach wenigen Tagen die koffeinbedingten kardiovaskulären Einflüsse (u. A. erhöhter Blutdruck) kompensiert (Mesas *et al.*, 2011). Der positive Effekt des Koffeins auf die kognitive Leistungsfähigkeit tritt wiederholt erst nach einer Latenzzeit mit anschließend erhöhter Koffeindosis auf (Addicott und Laurienti, 2009; James und Rogers, 2005). Im Gegensatz dazu sind die Gewöhnungseffekte bei der lokomotorischen Aktivität mit keiner Dosis zu überbrücken (Kaplan *et al.*, 1993). Diese Toleranzeffekte sind nicht auf

Veränderungen der Rezeptordichte zurückzuführen (Holtzman *et al.*, 1991), was den in 3.2 aufgeführten Daten entspricht, sondern auf andere, bisher unbekannte adaptive Prozesse. Möglicherweise spielt dabei der erhöhte Adenosinspiegel eine übergeordnete Rolle und ist gegebenenfalls auch an der vermuteten neuroprotektiven Wirkung beteiligt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf neuroprotektive Effekte von chronischem Koffeinkonsum

In dieser Arbeit wurde mithilfe von PET und Mikrodialyse der Einfluss von Koffein auf das adenosinerge System untersucht. In 1.3.4 wurde bereits dargelegt, dass Koffein neuroprotektiv gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson wirken könnte. Bisher konnten die zugrunde liegenden molekularen Wirkmechanismen noch nicht aufgeschlüsselt werden, so dass ein echter Evidenzbeweis fehlt. An dieser Stelle soll daher eine mögliche neuroprotektive Wirkung des chronischen Koffeinkonsums unter Einbezug der Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert werden.

Präsynaptisch löst die chronische Koffeinapplikation von 30 mg/kg KG/d (4 – 5 Tassen Kaffee/d) einen erhöhten Adenosinspiegel um ca. das Vierfache im Kortex und um ca. das Doppelte im Thalamus aus. Unter pathologischen Stress- bzw. Ischämiezuständen wird ebenfalls vermehrt Adenosin ausgeschüttet, sodass sogar mikromolare Adenosinkonzentrationen auftreten (Latini *et al.*, 1999; Rudolphi *et al.*, 1992a). Die Werte bei chronischer Koffeinapplikation bleiben jedoch weiterhin im physiologischen nanomolaren Bereich. Dunwiddie und Masino (2001) vermuten, dass die pathologisch erhöhte Adenosinkonzentration dazu beiträgt, neuronale Gewebeschäden zu vermeiden (vgl. 1.3.4). Ein ähnlicher, gleichwohl schwächer ausgeprägter Effekt könnte insofern auch mit dem beobachteten Anstieg des Adenosins bei chronischem Koffeinkonsum vorhanden sein. Dafür spricht, dass gezeigt

werden konnte, dass im Alzheimer–Mausmodell signifikant reduzierte Adenosinspiegel vorliegen, die jedoch nach einer 18–tägigen Koffeinapplikation verschwinden (Arendash *et al.*, 2006). Darüber hinaus weisen diese Mäuse eine verringerte, zerebrale Durchblutung auf (Paris *et al.*, 2004), die durch die vasodilatierenden Eigenschaften des Adenosins verbessert wurden (Arendash *et al.*, 2006). Es könnten daher mehrere potentiell neuroprotektive Mechanismen vorliegen, sodass eine chronische Koffeinapplikation sogar bei einer bereits ausgebildeten Alzheimerkrankheit vorteilhaft sein könnte.

Auf der postsynaptischen Seite wurde in der Vergangenheit die koffeinbedingte Blockade und die damit verbundene Aufregulation des A₁AR als potenziell neuroprotektiver Mechanismus diskutiert (Rudolphi *et al.*, 1989; de Mendonca *et al.*, 2000; Rivera-Oliver und Diaz-Rios, 2014; Tsutsui *et al.*, 2004). Dem gegenüber steht jedoch, wie in 1.3.3 aufgeführt, dass in In vitro–Studien keine einheitlichen, molekularspezifischen Veränderungen des A₁AR nach chronischer Koffeinapplikation beobachtet werden konnten (Johansson *et al.*, 1996; Traversa *et al.*, 1994; Green und Stiles, 1986; Chou *et al.*, 1985; Fredholm, 1982). Anhand der in dieser Arbeit generierten Daten ist ferner davon auszugehen, dass in vivo keine Aufregulation, sondern basale BP_{ND}–Werte des A₁AR durch die verbliebende Xanthinkonzentration maskiert werden (vgl. 4.1.1). Es bleibt daher zweifelhaft, ob tatsächlich die A₁AR–Aufregulierung durch Koffein verantwortlich für die potentiell neuroprotektive Wirkung ist. Im Übrigen wurde eine Aufregulierung und Sensibilisierung des A₁AR auch in der Alzheimer–Pathologie beobachtet, was zwar sowohl als Kompensationsmechanismus wie aber auch als autochthoner Bestandteil des pathologischen Prozesses gedeutet werden kann (Albasanz *et al.*, 2008; Angulo *et al.*, 2003).

Dennoch sollte die koffeinbedingte Blockade des A₁AR als potenzieller Schutz gegenüber neurodegenerativen Erkrankungen nicht *a priori* ausgeschlossen

werden. Denn es sind noch weitere, indirekte Mechanismen vorhanden, über die es zu adenosinvermittelten Veränderungen kommen kann. Nach Acquas *et al.* (2002) erhöht Koffein über die Blockade des A₁AR die extrazelluläre AcetylcholinKonzentration, die beim Morbus Alzheimer drastisch verringert wird. In diesem Zusammenhang sollte aber bedacht werden, dass aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Koffeins (maximal vier Stunden) nur temporär therapeutische Koffeinspiegel vorliegen. Dies kann bedeuten, dass eine anhaltende Gegenwart von Koffein nicht erforderlich ist oder der Schutz unter anderem auch durch die pharmakologisch länger aktiven Metabolite ausgelöst wird. Gegen ersteres spricht die Tatsache, dass wenn ein temporär therapeutischer Koffeinspiegel für den neuronalen Schutz ausreicht, dies auch durch die akute Applikation erreicht werden müsste. Dem ist aber nicht so, da die akute Gabe von Koffein sogar die ischämischen, neuronalen Schäden signifikant erhöht (Effektinversion) (Sutherland *et al.*, 1991; de Mendonca *et al.*, 2000). Für die potentiell neuroprotektive Wirkung der Metabolite konnte im Parkinson-Modell hingegen gezeigt werden, dass Theophyllin und Paraxanthin bei vergleichbaren Dosen den koffeinbedingten neuroprotektiven Effekt nachahmen (Xu *et al.*, 2010). Darüber hinaus verbesserte Theophyllin auch die motorischen Symptome bei Parkinsonpatienten (Mally und Stone, 1994).

Neben der Blockade des A₁AR, bindet Koffein als unselektiver Adenosinantagonist auch an den A_{2A}AR. Folglich stellt die koffeinbedingte Blockade des A_{2A}AR einen weiteren Pfad dar, über den ein potenzieller Schutzmechanismus bei neurodegenerativen Erkrankungen wirksam werden könnte. In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass die alzheimerspezifischen kognitiven Beeinträchtigungen sowohl durch Koffein als auch durch selektive A_{2A}AR-Antagonisten verhindert werden (Dall'Igna *et al.*, 2007; Canas *et al.*, 2009a). Darüber hinaus konnte im A_{2A}AR-Knockoutmodell

nachgewiesen werden, dass eine direkte, intrazerebrale Infusion von alzheimerspezifischen Proteinen keinerlei kognitive Defizite auslöst (Canas *et al.*, 2009b).

Der A_{2A}AR ist vor allem im Striatum, einem Areal, was wesentlich von Morbus Parkinson betroffen ist, besonders hoch konzentriert. Wie bereits in 1.3.4 beschrieben, interagiert der A_{2A}AR antagonistisch mit den kolokalisierten Dopaminrezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass eine koffeinbedingte A_{2A}AR-Blokade die Motorik bei Parkinsonpatienten durch eine verstärkte nigrostriatale Transmission verbessert (Kalda *et al.*, 2006; Ferre *et al.*, 1991). Darüber hinaus wird die dopaminerge Wirkung durch die Koapplikation von A_{2A}R-Antagonisten und Dopamin-Agonisten potenziert (Ferre *et al.*, 1994). Dies hat dazu geführt, dass sich A_{2A}AR-Antagonisten mittlerweile in der klinischen Prüfung befinden, um ggf. als Komedikation bei Morbus Parkinson eingesetzt zu werden.

Zusammenfassend stärken die hier generierten Daten die Hypothese, dass sowohl Koffein als auch die pharmakologisch aktiven Metabolite eine Rolle bei neuroprotektiven Wirkmechanismen spielen können. Dabei kommen mehrere Mechanismen in Betracht, die sowohl direkt über den adenosinergen Pfad, aber auch indirekt über die Adenosinrezeptor-induzierten Stoffwechselwege wirksam werden können. Koffein selbst vermittelt seine neuroprotektive Wirkung möglicherweise synergistisch sowohl über den A₁AR als auch über den A_{2A}AR. Ein erhöhter Adenosinspiegel scheint jedoch auch direkt in den Schutz von Neuronen involviert zu sein. In diesem Zusammenhang wurde bereits versucht, analoge Effekte durch die Hemmung adenosinabbauender Enzyme zu generieren (für weitere Informationen, s. Wardas (2002)) oder Adenosin-antagonisten einzusetzen.

4.3 Diskussion der verwendeten Methoden

4.3.1 Tiermodell und die Übertragbarkeit auf den Menschen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich männliche Sprague–Dawley–Ratten verwendet, um hormonbedingte Einflüsse ausschließen zu können. Im Allgemeinen stellen Ratten aufgrund ihrer einfachen und standardisierten Haltungsbedingungen sowie ihrer sehr gut charakterisierten Physiologie ein geeignetes Tiermodell für Untersuchungen am Gehirn dar. Darüber hinaus werden sie vielfach aufgrund ihrer Körpergröße und der daraus resultierenden Gehirngröße, die für bildgebende und invasive Studien von besonderer Bedeutung ist, eingesetzt. Daneben ist auch die relative Zahmheit der Ratte, die insbesondere für Mikrodialysestudien relevant ist, von Vorteil.

Nachfolgend werden die speziesspezifischen Unterschiede zwischen Mensch und Ratte diskutiert. Während Menschen monophasische Schläfer sind und ihr Schlaf größtenteils in einer durchgehenden, einzigen Schlafphase zusammengefasst werden kann, stellen Ratten polyphasische Schläfer dar (Tobler, 1989). Bei polyphasischen Schläfern wird der während der Wachphase sukzessiv aufgebaute Adenosinspiegel zwischenzeitlich mit den fragmentierten Schlafepisoden wieder abgebaut. In der Vergangenheit zeigte sich jedoch, dass in Ratte und Mensch ein vergleichbares, zirkadianes Konzentrations–Zeit–Profil generiert wird (Huston *et al.*, 1996; Zeitzer *et al.*, 2006). Weiterhin konnten auf molekularer Ebene in Bezug auf Rezeptorausstattung– und verteilung des A₁AR Ähnlichkeiten, aber auch regionenspezifische Unterschiede festgestellt werden (Fastbom *et al.*, 1987a). Die Anatomie der schlafassoziierten Zentren sowie die grundlegenden Eigenschaften des adenosinergen Systems beider Spezies sind insofern miteinander vergleichbar.

Wie bereits in 1.3.1 beschrieben, gibt es jedoch beim Koffeinstoffwechsel Unterschiede in der Pharmakokinetik von Nager und Mensch. Während die Absorption, Distribution und Elimination annähernd gleich sind, variiert vor allem der Metabolismus des Koffeins speziesspezifisch. Beim Menschen sind die pharmakologisch aktiven Metabolite Theophyllin und Paraxanthin von besonderem Interesse, wobei bei Nagern vor allem Paraxanthin als Hauptmetabolit anzutreffen ist (Arnaud, 1987; Arnaud, 1993). Außerdem weisen Ratten im Vergleich zum Menschen eine fast vierfach schnellere Metabolisierung auf (Shukitt-Hale *et al.*, 2013). Um die Übertragbarkeit zum humanen, täglichen Kaffeekonsum von 4 bis 5 Tassen Kaffee/d (=7,14 mg/kg KG/d) gewährleisten zu können, wurde in dieser Arbeit daher die Dosis der Tiere um diesen Faktor, auf 30 mg/kg KG/d erhöht (vgl. 2.2). Weiterhin entspricht der in dieser Studie gewählte Applikationszeitraum neun Lebensjahren beim Menschen (vgl. 4.1.1).

Neben der unterschiedlichen Metabolisierungsrate variiert vor allem die biologische Plasma-Halbwertszeit der beiden Spezies. Während diese im Menschen ca. 2 bis 5 Stunden beträgt (Arnaud, 1987), treten bei Ratten analoge Werte erst ab einer Dosis von 10 mg/kg KG Koffein auf (Bortolotti *et al.*, 1990; Wang und Lau, 1998; Liu *et al.*, 2005).

Zusammenfassend konnte unter Berücksichtigung der genannten Parameter eine weitgehende Vergleichbarkeit zwischen dem chronischen Kaffeekonsum beim Menschen und der experimentellen oralen Koffeinaufnahme hergestellt werden. Die dargestellten Unterschiede können zwar die Übertragbarkeit der in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse auf den Menschen vermindern, jedoch lassen sich valide Analogien zu der humanen Physiologie sowie deren koffeinbedingte Veränderungen herstellen.

4.3.2 Der Einsatz der PET

In dieser Studie wurde unter Verwendung der PET der zeitliche Verlauf der A₁AR–Dichte nicht–invasiv dargestellt. Dies ist die erste Studie dieser Art und zugleich die erste Studie, die konsequent In vivo–Untersuchungen einsetzt, um die komplexen Regelungs– und Feedbackmechanismen, die im Gesamtorganismus bei chronischer Koffeineinnahme resultieren, erfassen zu können.

In den vergangenen Jahren wurden in diesem Institut die Grundlagen dafür entwickelt, um mithilfe der PET und dem Radioliganden [¹⁸F]CPFPX die A₁AR–Dichte in Rattengehirnen nicht–invasiv und quantitativ zu messen. Es gibt derzeit nur zwei weitere Einrichtungen weltweit (in Japan und den Niederlanden), in denen vergleichbare Studien durchgeführt werden können. Der verwendete Radioligand [¹⁸F]CPFPX bindet hochaffin und hochselektiv als A₁AR–Antagonist an die Rezeptoren im Gehirn diverser Spezies (Holschbach *et al.*, 2002; Kroll *et al.*, 2014; Bauer *et al.*, 2003b). Gemäß dem Tracerprinzip haben Elmenhorst *et al.* (2013) eine maximal injizierte Stoffmenge von 2,3 nmol für eine maximal 5 %–Blockade des Rezeptors durch [¹⁸F]CPFPX gefunden. In dieser Studie beträgt die mittlere, injizierte Stoffmenge $0,388 \pm 0,241$ nmol. Folglich ist davon auszugehen, dass der Radioligand den zu untersuchenden Rezeptor pharmakologisch nicht beeinflusst.

Im Hinblick auf die Daten– und Bildauswertung (s. 2.4.5) wurde das Bindungspotential über ein referenzbasiertes, nicht–invasives, kinetisches Modell (SRTM) quantifiziert. In dieser Arbeit wurde der *Bulbus olfactorius* als Referenzregion verwendet. Zuvor konnte gezeigt werden, dass die geringe Menge an spezifisch gebundenem [¹⁸F]CPFPX im *Bulbus olfactorius* der Anwendung des SRTM nicht entgegensteht (Elmenhorst *et al.*, 2013). Die in dieser Arbeit dargestellten Befunde in den Kontrolltieren reproduzieren

zuverlässig frühere Studien, die zeigen, dass die A₁AR–Quantifizierung in A₁AR–reichen Regionen sehr stabil ist und in A₁AR–ärmeren Regionen trotz höherer Standardabweichungen gleichwohl reproduzierbar möglich ist. Die SRTM mit *Bulbus olfactorius* als Referenzregion erzeugt unter den getesteten Verfahren die stabilsten Parameter für die Evaluierung und Berechnung des [¹⁸F]CPFPX–Bindungspotentials (Kroll *et al.*, 2014) und zeigen darüber hinaus eine sehr gute Übereinstimmung mit der invasiv bestimmten Zielgröße BP_{ND} (Elmenhorst *et al.*, 2013).

Für das adenosinerge System konnten auch bei anderen Methoden grundsätzlich gute Korrelationen zwischen In vitro– und In vivo–Daten aufgezeigt werden (Bortolotti *et al.*, 1990; Mathot *et al.*, 1995). Dennoch sind In vivo–Studien zu bevorzugen, da in vitro die vorherrschenden artifiziellen Bedingungen (wie z.B. die enzymatische Situation) zwar minimiert, jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden können. Zugleich können bei In vitro–Studien die komplexen Wechselwirkungen, die sich z. B. aus dem Leberstoffwechsel für die jeweilige Gehirnkonzentration des Koffeins ergeben, nicht berücksichtigt werden. Diese Effekte sind jedoch (z. B. aufgrund von enzymatischen Induktionseffekten) bei Studien zur chronischen Wirkung von Stoffen besonders bedeutsam. Aus diesem Grund stellt die In vivo–PET ein besonders geeignetes Verfahren für die vorliegende Fragestellung dar. Gleichwohl gibt es auch hier Aspekte, die berücksichtigt werden müssen. Dazu gehören die zur PET–Messung erforderliche Anästhesie und der damit verbundene Einfluss auf die Rezeptordichte. Optimal wäre es, die PET–Scans bei Bewusstsein der Tiere durchzuführen, um potenzielle Anästhesie– bzw. Isofluran–Einflüsse ausschließen zu können. Das ist jedoch aus praktischen Gründen sehr schwierig, da die Messung ohne Narkose komplizierte Trainingsmaßnahmen mit hohem Ausfallrisiko voraussetzt und darüber hinaus trotz bester Randbedingungen einen erhöhten Stress für die Tiere bedeutet.

Hohe Stresslevel würden die Ergebnislage allerdings ebenso verfälschen, da das adenosinerge System besonders sensibel auf erhöhten Stress reagiert (Latini *et al.*, 1999; Rudolphi *et al.*, 1992a). Das von uns gewählte Studiendesign bietet die Möglichkeit, die nachteiligen Effekte teilweise zu reduzieren, da durch die Einführung einer Kontrollgruppe, die stets analog zur Koffeingruppe behandelt wurde, zwar die Einflussfaktoren nicht beseitigt, jedoch in beiden Versuchsgruppen gleichermaßen wirksam werden. Ein beobachteter Unterschied ist damit in erster Linie der Intervention, also im vorliegenden Fall der Koffeinapplikation, zuzuschreiben. Darüber hinaus gab es scanunabhängig keine signifikanten Unterschiede in der Dauer der Anästhesie in beiden Gruppen. Intraindividuell konnte jedoch innerhalb der Kontrollgruppe eine minimal niedrigere [^{18}F]CPFPX-Bindung bei der dritten Messung (Tag 2), die weniger als 24 h nach der zweiten Messung stattfand, beobachtet werden. Dieser Effekt wich nicht signifikant von den anderen Basal-Werten ab (vgl. Abb. 3.3) und konnte bereits von Kroll *et al.* (2014) aufgezeigt werden.

Da die PET über eine Anbindung des Radioliganden an den Zielrezeptor funktioniert, muss bei Kompetitionsstudien der Kompetitor (*hier*: Koffein) vor der PET-Messung abgesetzt werden. Die dafür erforderliche Zeitspanne richtet sich nach der biologischen Halbwertszeit der Testsubstanz. Folglich musste aufgrund der Konkurrenz des Koffeins mit dem hier verwendeten Radiotracer [^{18}F]CPFPX nach der 12-wöchigen Applikation das Koffein abgesetzt werden. Nach einer 4 bis 6-stündigen Koffeinkarenz konnte die PET-Messung stattfinden. Insbesondere bei der PET-Messung an Tag 1 des Absetzens konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass noch langlebige Koffeinmetabolite im Blut zirkulierten, welche eine gewisse Affinität zum A₁AR besitzen (vgl. 4.1.1). Da die *in vitro* beobachteten, molekularspezifischen Veränderungen (sowohl Aufregulation als auch unveränderte Rezeptordichte) über mindestens 48 Stunden bestehen blieben, ist davon auszugehen, dass nach mehrwöchiger

Koffeingabe die potenziellen Modifikationen in der A₁AR-Dichte nicht innerhalb eines Tages revidiert werden. Der zugrunde liegende Xanthin-Plasmaspiegel wurde unter Zuhilfenahme von Literaturbefunden errechnet, da aufgrund des longitudinalen Studiendesigns keine Plasmaproben generiert werden konnten. In Folgestudien sollten jedoch die Plasmaspiegel zu den jeweiligen Messzeitpunkten unmittelbar aus Blutproben ermittelt werden.

Wie in 1.3.3 bereits erwähnt, liegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren teilweise in unterschiedlichen Affinitätszuständen vor. Dies ist insbesondere von Bedeutung, wenn die Wirkung mithilfe von Agonisten untersucht wird. Antagonisten binden nach allgemeinem Verständnis jedoch gleichermaßen an hoch- wie niedrigaffine Rezeptorzustände (Lohse *et al.*, 1984), sodass davon auszugehen ist, dass mit der In vivo-PET und [¹⁸F]CPFPX die Gesamt-Rezeptordichte ermittelt wird. Ein potentieller Shift vom niedrig- zum hochaffinen Zustand, welcher durch die chronische Koffeinapplikation ausgelöst worden sein könnte, kann daher mit der hier eingesetzten In vivo-PET-Methode nicht dargestellt werden. Dieser molekulare Zusammenhang bedarf daher weiterer Untersuchungen.

4.3.3 Der Einsatz der Mikrodialyse

Mittels der In vivo-Mikrodialyse können niedermolekulare Stoffe, wie z.B. endogene Metabolite oder Neurotransmitter, im Extrazellulärraum verschiedener Gewebe bestimmt werden (Ungerstedt, 1986). Dabei ist eine kontinuierliche Gewinnung des Dialysats am wachen Tier über einen längeren Zeitraum möglich. Vorteilhaft dabei ist vor allem der Verzicht auf eine permanente Anästhesie während der mikrodialytischen Ableitung, sodass potentielle Narkoseeffekte weitestgehend ausgeschlossen werden können. Weiterhin kann bei der anschließenden Analyse auf weitere Reinigungsschritte verzichtet werden, da die Dialysemembran mit einer Porengröße von 6 kDa

potenziell abbauende Proteine fernhält. In dieser Arbeit wurden ausschließlich im Eigenbau hergestellte Sonden verwendet, die eine In vitro–Wiederfindungsrate von ca. 7 % aufweisen. Die In vitro–Wiederfindungsrate von Adenosin beträgt nach CMA Mikrodialysis, Schweden maximal 10 % (Membranlänge: 2 mm). Neben der vergleichbaren In vitro–Wiederfindungsrate ist auch das kostengünstige Material bei der Eigenproduktion von Vorteil. Darüber hinaus erlauben die selbst hergestellten Sonden eine genaue Anpassung an die Zielregion.

Dem gegenüber stehen gewisse Nachteile der Mikrodialyse, die berücksichtigt werden müssen. Zunächst stellt die Implantation der Führungskanülen ein invasives Verfahren dar, bei dem das umliegende Gewebe geschädigt und ggf. inflammatorische Reaktionen ausgelöst werden können. Die damit verbundene Transmitterfreisetzung (z.B. Glutamat) sowie die kurzzeitige Veränderung der Permeabilität der Blut–Hirn–Schranke sind jedoch in der Regel auf einen Zeitraum von ca. 24 Stunden begrenzt (Westerink, 1995). Die dadurch erforderliche Wartezeit vor Testbeginn sollte andererseits nicht zu lang sein, da nach einer postoperativen Erholungszeit von vier Tagen zunehmend Gliawachstum rund um die implantierte Sonde beobachtet werden kann. Die Ausbildung einer Gliose führt zur deutlichen Abnahme der basalen Neurotransmitterkonzentration aufgrund der entstandenen mechanischen Barriere, die die Zielsubstanzen an der Diffusion aus dem Interstitium hindern kann. In dieser Arbeit betrug der Erholungszeitraum aus Tierschutz–Gründen sieben Tage. Da jedoch eine Kontrollgruppe mitgeführt wurde, ist der Einfluss glialer Effekte in beiden Gruppen gleichermaßen ausgebildet und im Ergebnis entsprechend kompensiert. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei der Bestimmung der In vitro–Wiederfindungsrate keine gliale Barriere entsteht und die berechnete korrigierte Adenosinkonzentration zu niedrig geschätzt wird, da in vivo ein

komplexeres System mit niedrigerem Diffusionskoeffizienten als in wässriger Lösung herrscht.

Auch die Analyse des Dialysats bedarf einer kritischen Betrachtung. Hier werden sehr sensitive Methoden herangezogen, da einerseits die Konzentrationen der gesuchten Substanzen im nanomolaren Bereich liegen und andererseits aufgrund der niedrigen Perfusionsgeschwindigkeit und des kurzen Sammelintervalls Probenvolumina im Mikroliter-Bereich resultieren. Zur Etablierung dieses experimentellen Set-ups wurden daher zahlreiche analytische Vorexperimente durchgeführt, die schlussendlich zeigten, dass die Analyse des extrazellulären Adenosins aus dem Dialysat ausschließlich mithilfe der Massenspektrometrie möglich war (vgl. 2.5.10). Das hochsensitive und selektive Massenspektrometrie-Verfahren erfolgte in Zusammenarbeit mit dem ZEA-3 des Forschungszentrums Jülich. Dabei wurden die zu analysierenden Proben verblindet bzw. kodiert übermittelt, um systemische Messfehler zu vermeiden. Als limitierender Faktor für die Analyse erwies sich die Nachweisgrenze von 0,5 nM bzw. die Bestimmungsgrenze von 1 nM. In früheren Studien konnten bereits sehr niedrige, Basalkonzentrationen von Adenosin im Dialysat aufgezeigt werden (Kalinchuk *et al.*, 2011). Besonders problematisch stellte sich die Analyse der kortikalen Kontrollgruppe während der Schlafphase dar, bei der zeitweise die Adenosinkonzentrationen sehr nahe an der Bestimmungsgrenze lagen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Nicht-Erreichen der Signifikanzschwelle zwischen der Wach- und Schlafphase innerhalb der Kontrollgruppe auch methodisch bedingt ist (vgl. 3.3.2).

Neben der komplexen technischen Analyse sind weiterhin die intraindividuelle Unterschiede der einzelnen Tiere zu betrachten. Zum einen sind trotz der festgelegten Koordinaten für den stereotaktischen Eingriff zur Implantation

der Führungskanüle aufgrund der unterschiedlichen Gehirngrößen minimale Abweichungen der Sondelänge nicht auszuschließen. Zum anderen können die individuellen zerebralen Adenosinkonzentrationen variieren, was seinen Ausdruck möglicherweise in den vor allem bei der Koffeingruppe zu beobachtenden Standardabweichungen findet (vgl. Abb. 3.10). Während innerhalb der Kontrollgruppe die maximale relative Standardabweichung 16 % beträgt, erhöht sich diese bei der Koffeingruppe auf maximal 40 %. Diese hohe Standardabweichung kann daher anteilig auf methodischen Ursachen beruhen, jedoch dürfte sie größtenteils auf die individuell unterschiedliche Ansprechrate der Tiere auf Koffein zurückzuführen sein. Im Menschen konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von individuellen pharmakokinetischen Parametern (u. A. Metabolisierungsrate) eine individuelle Reaktion jedes einzelnen Teilnehmers auf Koffein ausgelöst wird (Bodenmann *et al.*, 2012; Grant *et al.*, 1983).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss einer chronischen Koffeinapplikation auf das adenosinerge System im Hinblick auf die Schlafregulation sowie auf seine potenziell neuroprotektiven Effekte bei neurodegenerativen Erkrankungen untersucht.

Präsynaptisch stellt Adenosin die nach bisheriger Kenntnis bedeutendste, endogen schlaffördernde Substanz dar, die während der Wachphase ansteigt und anschließend in der damit induzierten Schlafphase wieder abgebaut wird. Die chronische Koffeinapplikation von 30 mg/kg Körpergewicht/Tag (d) (4 – 5 Tassen Kaffee/d) über 12 Wochen löst einen erhöhten Adenosinspiegel im Kortex und tendenziell im Thalamus aus. Ausschließlich im Kortex konnte ein signifikanter Anstieg festgestellt werden. Die fehlende Signifikanz im Thalamus, trotz grundsätzlich erhöhter Spiegel, ist möglicherweise auf die höhere intraindividuelle Varianz und die damit verbundene unterschiedliche Ansprechrate auf Koffein zurückzuführen. Der Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration kompensiert auf diese Weise die antagonistische Wirkung von Koffein am Rezeptor. Folglich wird Koffein durch die höhere Agonistenkonzentrationen wieder verdrängt und die homöostatischen Bedingungen auf diese Weise wieder hergestellt. Des Weiteren vermindert ein erhöhter Adenosinspiegel neuronale Gewebeschäden, sodass der beobachtete Anstieg des Adenosins auch auf diesem Wege zur vermuteten neuroprotektiven Wirkung des Koffeins beitragen könnte.

Koffein antagonisiert den endogenen Liganden Adenosin überwiegend am A_1 -Adenosinrezeptor (A_1AR), da dieser ubiquitär in fast allen Hirnarealen vorkommt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss der chronischen Koffeingabe auf die A_1AR -Expression im ZNS der Ratte mittels Positronen-Emissionstomografie (PET) untersucht. Dazu musste das Koffein

aufgrund seiner Konkurrenz mit dem hier verwendeten Radiotracer [^{18}F]CPFPX ([Fluor-18] 8-cyclopentyl-3-(3-fluoropropyl)-1-propylxanthin)) im Anschluss an die 12-wöchige Applikation abgesetzt werden, um zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Beendigung der Koffeinapplikation PET-Messungen durchführen zu können. Hierbei weisen die koffeinbehandelten Tiere an Tag 1 nach Absetzen des Koffeins (nach ca. 4 h, Scan 2) deutlich herabgesetzte Bindungspotential- (BP_{ND}) -Signale (bzw. eine geringere [^{18}F]CPFPX-Bindung) im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die geringere [^{18}F]CPFPX-Bindung ist dabei möglicherweise auf eine noch vorhandene Blockade des $A_1\text{AR}$ zurückzuführen, die durch ein Zusammenspiel verschiedener Xanthin-Restplasmaspiegel (Koffein und Metabolite) erklärt werden kann. Diese maskieren initial das basale Bindungspotenzial des $A_1\text{AR}$, sind jedoch ab Tag 2 nach Absetzen der chronischen Koffeineinnahme nicht mehr von den Werten der Kontrollgruppe zu unterscheiden. Anhand dieser Ergebnisse ist die bislang häufig diskutierte Aufregulation des $A_1\text{AR}$ als potenziell neuroprotektiver Wirkmechanismus in Frage zu stellen. Die vorliegenden Befunde schließen zwar nicht aus, dass die Blockade des $A_1\text{AR}$ durch Koffein und seiner Metabolite unmittelbar als Schutzfaktor wirksam sind, lassen jedoch eher vermuten, dass der chronische Koffeinkonsum zu komplexen regulatorischen Veränderungen führt, welche, wie hier gezeigt, präsynaptische Prozesse involvieren und darüber hinaus wahrscheinlich auch indirekte Effekte in nicht-adenosinergen Systemen (z. B. Acetylcholin) auslösen. Zukünftige Untersuchungen sollten sich daher auf diese Aspekte fokussieren.

6 Abkürzungsverzeichnis

[¹⁸ F]CPFPX	[Fluor-18] 8-cyclopentyl-3-(3-fluoropropyl)-1-propylxanthin
A ₁ AR	A ₁ -Adenosinrezeptor
A _{2A} AR	A _{2A} -Adenosinrezeptor
ACh	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	anteroposterior
ARAS	aszendierendes retikuläres System
ATP	Adenosintriphosphat
BF	basales Vorderhirn
BL	Baseline
B _{max}	Maximale Rezeptorbindung
BP _{ND}	Non-displaceable binding potential
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit
CYP1A2	Cytochrom P450 1A2
d	Tag

DRN	dorsalen Raphekerns
EEG	Elektroenzephalogramm
FC	frontaler Kortex
GABA	γ -Aminobuttersäure
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
Halbwertszeit	$t_{1/2}$
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatografie, Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
IC ₅₀ -Wert	Halbmaximale Inhibitionskonstante
IL-1	Interleukin-1
IMP	Inosinmonophosphat
iNOS	induzierbare NO-Synthase
K _D	Dissoziationskonstante
KG	Körpergewicht
LC	Locus coeruleus
LDT	laterodorsales Tegmentum
LH	lateralen Hypothalamus
LPOA	laterales präoptisches Areal
ML	mediolateral

mRNA	Messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
Ncl.	Nukleus
NF- κ B	nukleären Transkriptionsfaktor kappa B
NOS	NO-Synthetase, Nitric oxide synthetase
NO _x	Stickstoffoxid
NREM	Non Rapid Eye Movement
NRT	retikuläre Thalamuskerne
NSF	N-ethylmaleimid-sensitive-factor
O ₂	Sauerstoff
p.o.	per os
PET	Positronen-Emissionstomografie
PPT	pedunculopontiner Nucleus
p-Wert	Signifikanzwert
REM	Rapid Eye Movement
rmANOVA	repeated measurement ANOVA, Varianzanalyse mit Messwiederholungen
RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenosylhomocystein

SD	Schlafentzug (sleep deprivation)
SNARE	Soluble N-ethylmaleimid-sensitive-factor attachment receptor
SRTM	Simplified Reference Tissue Model
SWS	Slow Wave Sleep
TAC	Time Activity Curve, Zeitaktivitätskurve
TMN	Nucleus tuberomammillaris des Hypothalamus
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
VA	Nucleus ventralis anterior thalami
VL	Nucleus ventralis lateralis thalami
VLPO	Nucleus preopticus venterolateralis des Hypothalamus
VP	Nucleus ventralis posterior
\bar{x}	Mittelwert
ZEa-3	Zentralinstitut für Engineering, Elektronik und Analytik des Forschungszentrums Jülich
ZNS	Zentralnervensystem
α	Statistisches Signifikanzniveau
σ	Standardabweichung

7 Literatur

Acquas E., Tanda G. and Di Chiara G., Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naïve and caffeine-pretreated rats, *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 2002, pp. 182-193.

Addicott M. A. and Laurienti P. J., A comparison of the effects of caffeine following abstinence and normal caffeine use, *Psychopharmacology*, 2009, pp. 423-431.

Agulhon C., Sun M. Y., Murphy T., Myers T., Lauderdale K. and Fiacco T. A., Calcium Signaling and Gliotransmission in Normal vs. Reactive Astrocytes, *Frontiers in pharmacology*, 2012, p. 139.

Aktan F., iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation, *Life sciences*, 2004, pp. 639-653.

Aktorius K., Förstermann U., Hofmann F. B. and Starke K., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2009.

Alam M. N., Kumar S., Rai S., Methippara M., Szymusiak R. and McGinty D., Role of adenosine A(1) receptor in the perifornical-lateral hypothalamic area in sleep-wake regulation in rats, *Brain research*, 2009, pp. 96-104.

Albasanz J. L., Perez S., Barrachina M., Ferrer I. and Martin M., Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease, *Brain pathology*, 2008, pp. 211-219.

Alhaider I. A., Aleisa A. M., Tran T. T., Alzoubi K. H. and Alkadhi K. A., Chronic caffeine treatment prevents sleep deprivation-induced impairment of cognitive function and synaptic plasticity, *Sleep*, 2010, pp. 437-444.

Angulo E., Casado V., Mallol J., Canela E. I., Vinals F., Ferrer I., Lluís C. and Franco R., A1 adenosine receptors accumulate in neurodegenerative structures in Alzheimer disease and mediate both amyloid precursor protein processing and tau phosphorylation and translocation, *Brain pathology*, 2003, pp. 440-451.

Aranda J. V., Cook C. E., Gorman W., Collinge J. M., Loughnan P. M., Outerbridge E. W., Aldridge A. and Neims A. H., Pharmacokinetic profile of caffeine in the premature newborn infant with apnea, *The Journal of pediatrics*, 1979, pp. 663-668.

Arendash G. W., Schleif W., Rezai-Zadeh K., Jackson E. K., Zacharia L. C., Cracchiolo J. R., Shippy D. and Tan J., Caffeine protects Alzheimer's mice against cognitive

impairment and reduces brain beta-amyloid production, *Neuroscience*, 2006, pp. 941-952.

Arnaud M. J., Identification, kinetic and quantitative study of [2-¹⁴C] and [1-Me-¹⁴C]caffeine metabolites in rat's urine by chromatographic separations, *Biochemical medicine*, 1976, pp. 67-76.

Arnaud M. J. and Welsch C., Caffeine metabolism in human subjects, 9th Symposium of the Association Scientifique Internationale du Cafe, ASIC Colloq. London., 1980, pp. 385-396.

Arnaud M. J., The pharmacology of caffeine, *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*, 1987, pp. 273-313.

Arnaud M. J., Metabolism of caffeine and other components of coffee, *Caffeine, Coffee and Health* (Grattini S ed), Raven Press, New York, 1993, pp. 43-95.

Aserinsky E. and Kleitman N., Regularly occurring periods of eye motility, and concomitant phenomena, during sleep, *Science*, 1953, pp. 273-274.

AWMF online, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften. Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin. Therapie idiopatischer Apnoen, Bradykardien und Hypoxämien bei Frühgeborenen., 2010

Basheer R., Bauer A., Elmenhorst D., Ramesh V. and McCarley R. W., Sleep deprivation upregulates A1 adenosine receptors in the rat basal forebrain, *Neuroreport*, 2007, pp. 1895-1899.

Bauer A., Holschbach M. H., Cremer M., Weber S., Boy C., Shah N. J., Olsson R. A., Halling H., Coenen H. H. and Zilles K., Evaluation of ¹⁸F-CPFPX, a novel adenosine A1 receptor ligand: in vitro autoradiography and high-resolution small animal PET, *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 2003a, pp. 1682-1689.

Bauer A., Holschbach M. H., Meyer P. T., Boy C., Herzog H., Olsson R. A., Coenen H. H. and Zilles K., In vivo imaging of adenosine A1 receptors in the human brain with [¹⁸F]CPFPX and positron emission tomography, *NeuroImage*, 2003b, pp. 1760-1769.

Bear M. F., Connors B. W. and Paradiso M. A., *Neurowissenschaften - Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. , 2009.

Bickford P. C., Fredholm B. B., Dunwiddie T. V. and Freedman R., Inhibition of Purkinje cell firing by systemic administration of phenylisopropyl adenosine: effect of central noradrenaline depletion by DSP4, *Life sciences*, 1985, pp. 289-297.

Bier D., Holschbach M. H., Wutz W., Olsson R. A. and Coenen H. H., Metabolism of the A(1)1 adenosine receptor positron emission tomography ligand [18F]8-cyclopentyl-3-(3-fluoropropyl)-1-propylxanthine ([18F]CPFPX) in rodents and humans, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 2006, pp. 570-576.

Blanchard J. and Sawers S. J., The absolute bioavailability of caffeine in man, *European journal of clinical pharmacology*, 1983, pp. 93-98.

Blanco-Centurion C., Xu M., Murillo-Rodriguez E., Gerashchenko D., Shiromani A. M., Salin-Pascual R. J., Hof P. R. and Shiromani P. J., Adenosine and sleep homeostasis in the Basal forebrain, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2006, pp. 8092-8100.

Bodenmann S., Hohoff C., Freitag C., Deckert J., Retey J. V., Bachmann V. and Landolt H. P., Polymorphisms of ADORA2A modulate psychomotor vigilance and the effects of caffeine on neurobehavioural performance and sleep EEG after sleep deprivation, *British journal of pharmacology*, 2012, pp. 1904-1913.

Boix F., Pfister M., Huston J. P. and Schwarting R. K., Substance P decreases extracellular concentrations of acetylcholine in neostriatum and nucleus accumbens in vivo: possible relevance for the central processing of reward and aversion, *Behavioural brain research*, 1994, pp. 213-219.

Bonati M., Latini R., Galletti F., Young J. F., Tognoni G. and Garattini S., Caffeine disposition after oral doses, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1982, pp. 98-106.

Bonati M., Latini R., Tognoni G., Young J. F. and Garattini S., Interspecies comparison of in vivo caffeine pharmacokinetics in man, monkey, rabbit, rat, and mouse, *Drug metabolism reviews*, 1984, pp. 1355-1383.

Borbely A. A., A two process model of sleep regulation, *Human neurobiology*, 1982, pp. 195-204.

Borbely A. A. and Tobler I., Endogenous sleep-promoting substances and sleep regulation, *Physiological reviews*, 1989, pp. 605-670.

Bortolotti A., Traina G. L., Guitani A., Marzi E., Latini R., Young J. F. and Bonati M., In vivo and perfused liver caffeine kinetics in the rat, *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, 1990, pp. 285-295.

Boulenger J. P., Patel J., Post R. M., Parma A. M. and Marangos P. J., Chronic caffeine consumption increases the number of brain adenosine receptors, *Life sciences*, 1983, pp. 1135-1142.

Boulenger J. P. and Marangos P. J., Caffeine withdrawal affects central adenosine receptors but not benzodiazepine receptors, *Journal of neural transmission. General section*, 1989, pp. 9-15.

Britton D. R., Mikusa J., Lee C. H., Jarvis M. F., Williams M. and Kowaluk E. A., Site and event specific increase of striatal adenosine release by adenosine kinase inhibition in rats, *Neuroscience letters*, 1999, pp. 93-96.

Burnstock G., Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission, *Physiological reviews*, 2007, pp. 659-797.

Callahan M. M., Robertson R. S., Arnaud M. J., Branfman A. R., McComish M. F. and Yesair D. W., Human metabolism of [1-methyl-14C]- and [2-14C]caffeine after oral administration, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 1982, pp. 417-423.

Canas P. M., Porciuncula L. O., Cunha G. M., Silva C. G., Machado N. J., Oliveira J. M., Oliveira C. R. and Cunha R. A., Adenosine A2A receptor blockade prevents synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2009a, pp. 14741-14751.

Canas P. M., Duarte J. M., Rodrigues R. J., Kofalvi A. and Cunha R. A., Modification upon aging of the density of presynaptic modulation systems in the hippocampus, *Neurobiology of aging*, 2009b, pp. 1877-1884.

Cao C., Cirrito J. R., Lin X., Wang L., Verges D. K., Dickson A., Mamcarz M., Zhang C., Mori T., Arendash G. W., Holtzman D. M. and Potter H., Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice, *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2009, pp. 681-697.

Cespuglio R., Burlet S., Marinesco S., Robert F. and Jouvett M., [Voltametric detection of cerebral NO in rats. Variations of the signal throughout the sleep-wakefulness cycle], *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 1996, pp. 191-200.

Chagoya de Sanchez V., Hernandez Munoz R., Suarez J., Vidrio S., Yanez L. and Diaz Munoz M., Day-night variations of adenosine and its metabolizing enzymes in the brain cortex of the rat--possible physiological significance for the energetic homeostasis and the sleep-wake cycle, *Brain research*, 1993, pp. 115-121.

Chen L., Majde J. A. and Krueger J. M., Spontaneous sleep in mice with targeted disruptions of neuronal or inducible nitric oxide synthase genes, *Brain research*, 2003, pp. 214-222.

Choi E. J., Bae S. H., Park J. B., Kwon M. J., Jang S. M., Zheng Y. F., Lee Y. S., Lee S. J. and Bae S. K., Simultaneous quantification of caffeine and its three primary metabolites in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food chemistry*, 2013, pp. 2735-2742.

Chou D. T., Khan S., Forde J. and Hirsh K. R., Caffeine tolerance: behavioral, electrophysiological and neurochemical evidence, *Life sciences*, 1985, pp. 2347-2358.

Chu Y. F., Chang W. H., Black R. M., Liu J. R., Sompol P., Chen Y., Wei H., Zhao Q. and Cheng I. H., Crude caffeine reduces memory impairment and amyloid beta(1-42) levels in an Alzheimer's mouse model, *Food chemistry*, 2012, pp. 2095-2102.

Chuo L. J., Sheu W. H., Pai M. C. and Kuo Y. M., Genotype and plasma concentration of cystatin C in patients with late-onset Alzheimer disease, *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 2007, pp. 251-257.

Colton T., Gosselin R. E. and Smith R. P., The tolerance of coffee drinkers to caffeine, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1968, pp. 31-39.

Conlay L. A., Conant J. A., deBros F. and Wurtman R., Caffeine alters plasma adenosine levels, *Nature*, 1997, p. 136.

Corradetti R., Lo Conte G., Moroni F., Passani M. B. and Pepeu G., Adenosine decreases aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices, *European journal of pharmacology*, 1984, pp. 19-26.

Cunha R. A., Constantino M. C., Sebastiao A. M. and Ribeiro J. A., Modification of A1 and A2a adenosine receptor binding in aged striatum, hippocampus and cortex of the rat, *Neuroreport*, 1995, pp. 1583-1588.

Curatolo P. W. and Robertson D., The health consequences of caffeine, *Annals of internal medicine*, 1983, pp. 641-653.

da Silva R. S., Bruno A. N., Battastini A. M., Sarkis J. J., Lara D. R. and Bonan C. D., Acute caffeine treatment increases extracellular nucleotide hydrolysis from rat striatal and hippocampal synaptosomes, *Neurochemical research*, 2003, pp. 1249-1254.

Dall'Igna O. P., Fett P., Gomes M. W., Souza D. O., Cunha R. A. and Lara D. R., Caffeine and adenosine A(2a) receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice, *Experimental neurology*, 2007, pp. 241-245.

Daly J. W., Butts-Lamb P. and Padgett W., Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines, *Cellular and molecular neurobiology*, 1983, pp. 69-80.

Daly J. W., Padgett W. L., Secunda S. I., Thompson R. D. and Olsson R. A., Structure-activity relationships for 2-substituted adenosines at A1 and A2 adenosine receptors, *Pharmacology*, 1993, pp. 91-100.

Daly J. W. and Fredholm B. B., Caffeine--an atypical drug of dependence, *Drug and alcohol dependence*, 1998, pp. 199-206.

Daval J. L., Deckert J., Weiss S. R., Post R. M. and Marangos P. J., Upregulation of adenosine A1 receptors and forskolin binding sites following chronic treatment with caffeine or carbamazepine: a quantitative autoradiographic study, *Epilepsia*, 1989, pp. 26-33.

de Lange E. C., de Boer A. G. and Breimer D. D., Methodological issues in microdialysis sampling for pharmacokinetic studies, *Advanced drug delivery reviews*, 2000, pp. 125-148.

de Mendonca A., Sebastiao A. M. and Ribeiro J. A., Adenosine: does it have a neuroprotective role after all?, *Brain research. Brain research reviews*, 2000, pp. 258-274.

Deckert J., Abel F., Kunig G., Hartmann J., Senitz D., Maier H., Ransmayr G. and Riederer P., Loss of human hippocampal adenosine A1 receptors in dementia: evidence for lack of specificity, *Neuroscience letters*, 1998, pp. 1-4.

Dettmer U., Folkerts M., Kächler E. and Sönnichsen A., *Intensivkurs Biochemie*: Elsevier GmbH, München, 2005.

Deutscher Kaffeverband e.V. Kaffeemarkt, 2013

Dixon A. K., Gubitza A. K., Sirinathsinghji D. J., Richardson P. J. and Freeman T. C., Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat, *British journal of pharmacology*, 1996, pp. 1461-1468.

Dorfman L. J. and Jarvik M. E., Comparative stimulant and diuretic actions of caffeine and theobromine in man, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1970, pp. 869-872.

Dössel O. and Buzug T. M., Biomedizinische Technik-Medizinische Bildgebung, In: S. B. and H. B. (eds), *Biomedizinische Technik-Medizinische Bildgebung*, Deutsche Gesellschaft für Biomedizinische Technik im VDE, 2014, pp. 173-199.

Duda A. and Dietrich P., Regulation der extrazellulär gebildeten Adenninnukleotide und Adenosin, 2008.

Dunwiddie T. V., Diao L. and Proctor W. R., Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 1997, pp. 7673-7682.

Dunwiddie T. V. and Masino S. A., The role and regulation of adenosine in the central nervous system, *Annual review of neuroscience*, 2001, pp. 31-55.

Dworak M., McCarley R. W., Kim T., Kalinchuk A. V. and Basheer R., Sleep and brain energy levels: ATP changes during sleep, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2010, pp. 9007-9016.

Ebermann R. and Elmadfa I., *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*, Wien: Springer-Verlag, 2008.

Elmenhorst D., Meyer P. T., Matusch A., Winz O. H., Zilles K. and Bauer A., Test-retest stability of cerebral A1 adenosine receptor quantification using [18F]CPFPX and PET, *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2007, pp. 1061-1070.

Elmenhorst D., Basheer R., McCarley R. W. and Bauer A., Sleep deprivation increases A(1) adenosine receptor density in the rat brain, *Brain research*, 2009, pp. 53-58.

Elmenhorst D., Garibotto V., Prescher A. and Bauer A., Adenosine A(1) receptors in human brain and transfected CHO cells: Inhibition of [(3)H]CPFPX binding by adenosine and caffeine, *Neuroscience letters*, 2011, pp. 415-420.

Elmenhorst D., Meyer P. T., Matusch A., Winz O. H. and Bauer A., Caffeine occupancy of human cerebral A1 adenosine receptors: in vivo quantification with 18F-CPFPX and PET, *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 2012, pp. 1723-1729.

Elmenhorst D., Kroll T., Wedekind F., Weisshaupt A., Beer S. and Bauer A., In vivo kinetic and steady-state quantification of 18F-CPFPX binding to rat cerebral A1 adenosine receptors: validation by displacement and autoradiographic experiments, *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, 2013, pp. 1411-1419.

Eskelinen M. H., Ngandu T., Tuomilehto J., Soininen H. and Kivipelto M., Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: a population-based CAIDE study, *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 2009, pp. 85-91.

Espinosa J., Rocha A., Nunes F., Costa M. S., Schein V., Kazlauckas V., Kalinine E., Souza D. O., Cunha R. A. and Porciuncula L. O., Caffeine consumption prevents memory impairment, neuronal damage, and adenosine A2A receptors upregulation

in the hippocampus of a rat model of sporadic dementia, *Journal of Alzheimer's disease* : JAD, 2013, pp. 509-518.

Estrada C. L., Danielson K. K., Drum M. L. and Lipton R. B., Insufficient sleep in young patients with diabetes and their families, *Biological research for nursing*, 2012, pp. 48-54.

European Food Information Council. Koffein und Gesundheit, *Food Today*, 2007

Evans B. M., Sleep, consciousness and the spontaneous and evoked electrical activity of the brain. Is there a cortical integrating mechanism?, *Neurophysiologie clinique = Clinical neurophysiology*, 2003, pp. 1-10.

Fastbom J., Pazos A., Probst A. and Palacios J. M., Adenosine A1 receptors in the human brain: a quantitative autoradiographic study, *Neuroscience*, 1987a, pp. 827-839.

Fastbom J., Pazos A. and Palacios J. M., The distribution of adenosine A1 receptors and 5'-nucleotidase in the brain of some commonly used experimental animals, *Neuroscience*, 1987b, pp. 813-826.

Ferrari L. F., Bogen O., Reichling D. B. and Levine J. D., Accounting for the delay in the transition from acute to chronic pain: axonal and nuclear mechanisms, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2015, pp. 495-507.

Ferre S., von Euler G., Johansson B., Fredholm B. B. and Fuxe K., Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, pp. 7238-7241.

Ferre S., O'Connor W. T., Snaprud P., Ungerstedt U. and Fuxe K., Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia, *Neuroscience*, 1994, pp. 765-773.

Florio C., Rosati A. M., Traversa U. and Vertua R., Circadian rhythm in adenosine A1 receptor of mouse cerebral cortex, *Life sciences*, 1991, pp. PL25-29.

Fredholm B. B., Adenosine actions and adenosine receptors after 1 week treatment with caffeine, *Acta physiologica Scandinavica*, 1982, pp. 283-286.

Fredholm B. B. and Dunwiddie T. V., How does adenosine inhibit transmitter release?, *Trends in pharmacological sciences*, 1988, pp. 130-134.

Fredholm B. B., Battig K., Holmen J., Nehlig A. and Zvartau E. E., Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use, *Pharmacological reviews*, 1999, pp. 83-133.

Fredholm B. B., AP I. J., Jacobson K. A., Klotz K. N. and Linden J., International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors, *Pharmacological reviews*, 2001, pp. 527-552.

Furst J., Sutton R. B., Chen J., Brunger A. T. and Grigorieff N., Electron cryomicroscopy structure of N-ethyl maleimide sensitive factor at 11 Å resolution, *The EMBO journal*, 2003, pp. 4365-4374.

Gasior M., Jaszyńska M., Munzar P., Witkin J. M. and Goldberg S. R., Caffeine potentiates the discriminative-stimulus effects of nicotine in rats, *Psychopharmacology*, 2002, pp. 385-395.

Gass N., Porkka-Heiskanen T. and Kalinchuk A. V., The role of the basal forebrain adenosine receptors in sleep homeostasis, *Neuroreport*, 2009, pp. 1013-1018.

Georgiev V., Johansson B. and Fredholm B. B., Long-term caffeine treatment leads to a decreased susceptibility to NMDA-induced clonic seizures in mice without changes in adenosine A1 receptor number, *Brain research*, 1993, pp. 271-277.

Goldstein A., Wakefulness Caused by Caffeine, *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 1964, pp. 269-278.

Goldstein A., Kaizer S. and Whitby O., Psychotropic effects of caffeine in man. IV. Quantitative and qualitative differences associated with habituation to coffee, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1969, pp. 489-497.

Grant D. M., Tang B. K. and Kalow W., Variability in caffeine metabolism, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1983, pp. 591-602.

Green R. M. and Stiles G. L., Chronic caffeine ingestion sensitizes the A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat cerebral cortex, *The Journal of clinical investigation*, 1986, pp. 222-227.

GV-SOLAS, Gesellschaft für Versuchstierkunde. Tiergerechte Haltung von Laborratten, 2004

Halassa M. M., Florian C., Fellin T., Muñoz J. R., Lee S. Y., Abel T., Haydon P. G. and Frank M. G., Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss, *Neuron*, 2009, pp. 213-219.

Hallanger A. E., Levey A. I., Lee H. J., Rye D. B. and Wainer B. H., The origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat, *The Journal of comparative neurology*, 1987, pp. 105-124.

Hawkins M., Dugich M. M., Porter N. M., Urbancic M. and Radulovacki M., Effects of chronic administration of caffeine on adenosine A1 and A2 receptors in rat brain, *Brain research bulletin*, 1988, pp. 479-482.

Heller H. C., A global rather than local role for adenosine in sleep homeostasis, *Sleep*, 2006, pp. 1382-1383; discussion 1387-1389.

Hermey G., Mahlke C., Schwake M. and Sommer T., *Der Experimentator: Neurowissenschaften*, 2010.

Holschbach M. H., Olsson R. A., Bier D., Wutz W., Sihver W., Schuller M., Palm B. and Coenen H. H., Synthesis and evaluation of no-carrier-added 8-cyclopentyl-3-(3-[(18)F]fluoropropyl)-1-propylxanthine ([18F]CPFPX): a potent and selective A(1)-adenosine receptor antagonist for in vivo imaging, *Journal of medicinal chemistry*, 2002, pp. 5150-5156.

Holtzman S. G., Mante S. and Minneman K. P., Role of adenosine receptors in caffeine tolerance, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1991, pp. 62-68.

Hu G., Bidel S., Jousilahti P., Antikainen R. and Tuomilehto J., Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease, *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 2007, pp. 2242-2248.

Huang Z. L., Urade Y. and Hayaishi O., The role of adenosine in the regulation of sleep, *Current topics in medicinal chemistry*, 2011, pp. 1047-1057.

Huston J. P., Haas H. L., Boix F., Pfister M., Decking U., Schrader J. and Schwarting R. K., Extracellular adenosine levels in neostriatum and hippocampus during rest and activity periods of rats, *Neuroscience*, 1996, pp. 99-107.

Iber C., Ancoli-Israel S., Chesson A. L. and Quan S. F., *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events*, American Academy of Sleep Medicine, 2007, p. 59.

Ikeda G. J., Sapienza P. P., McGinnis M. L., Bragg L. E., Walsh J. J. and Collins T. F., Blood levels of caffeine and results of fetal examination after oral administration of caffeine to pregnant rats, *Journal of applied toxicology : JAT*, 1982, pp. 307-314.

Innis R. B., Cunningham V. J., Delforge J., Fujita M., Gjedde A., Gunn R. N., Holden J., Houle S., Huang S. C., Ichise M., Iida H., Ito H., Kimura Y., Koeppe R. A., Knudsen G.

M., Knuuti J., Lammertsma A. A., Laruelle M., Logan J., Maguire R. P., Mintun M. A., Morris E. D., Parsey R., Price J. C., Slifstein M., Sossi V., Suhara T., Votaw J. R., Wong D. F. and Carson R. E., Consensus nomenclature for in vivo imaging of reversibly binding radioligands, *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2007, pp. 1533-1539.

Isakovic A. J., Abbott N. J. and Redzic Z. B., Brain to blood efflux transport of adenosine: blood-brain barrier studies in the rat, *Journal of neurochemistry*, 2004, pp. 272-286.

Jacobson K. A., von Lubitz D. K., Daly J. W. and Fredholm B. B., Adenosine receptor ligands: differences with acute versus chronic treatment, *Trends in pharmacological sciences*, 1996, pp. 108-113.

Jain N., Kemp N., Adeyemo O., Buchanan P. and Stone T. W., Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice, *British journal of pharmacology*, 1995, pp. 2127-2133.

James J. E. and Rogers P. J., Effects of caffeine on performance and mood: withdrawal reversal is the most plausible explanation, *Psychopharmacology*, 2005, pp. 1-8.

Jarvis M. F., Jackson R. H. and Williams M., Autoradiographic characterization of high-affinity adenosine A2 receptors in the rat brain, *Brain research*, 1989, pp. 111-118.

Johansson B., Ahlberg S., van der Ploeg I., Brene S., Lindefors N., Persson H. and Fredholm B. B., Effect of long term caffeine treatment on A1 and A2 adenosine receptor binding and on mRNA levels in rat brain, *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 1993, pp. 407-414.

Johansson B., Georgiev V., Kuosmanen T. and Fredholm B. B., Long-term treatment with some methylxanthines decreases the susceptibility to bicuculline- and pentylenetetrazol-induced seizures in mice. Relationship to c-fos expression and receptor binding, *The European journal of neuroscience*, 1996, pp. 2447-2458.

Jones B. E., Activity, modulation and role of basal forebrain cholinergic neurons innervating the cerebral cortex, *Progress in brain research*, 2004, pp. 157-169.

Jones B. E., Glia, adenosine, and sleep, *Neuron*, 2009, pp. 156-157.

Kalaria R. N., Sromek S., Wilcox B. J. and Unnerstall J. R., Hippocampal adenosine A1 receptors are decreased in Alzheimer's disease, *Neuroscience letters*, 1990, pp. 257-260.

Kalda A., Yu L., Oztas E. and Chen J. F., Novel neuroprotection by caffeine and adenosine A(2A) receptor antagonists in animal models of Parkinson's disease, *Journal of the neurological sciences*, 2006, pp. 9-15.

Kalinchuk A. V., Stenberg D., Rosenberg P. A. and Porkka-Heiskanen T., Inducible and neuronal nitric oxide synthases (NOS) have complementary roles in recovery sleep induction, *The European journal of neuroscience*, 2006, pp. 1443-1456.

Kalinchuk A. V., McCarley R. W., Porkka-Heiskanen T. and Basheer R., The time course of adenosine, nitric oxide (NO) and inducible NO synthase changes in the brain with sleep loss and their role in the non-rapid eye movement sleep homeostatic cascade, *Journal of neurochemistry*, 2011, pp. 260-272.

Kaplan G. B., Greenblatt D. J., Kent M. A. and Cotreau-Bibbo M. M., Caffeine treatment and withdrawal in mice: relationships between dosage, concentrations, locomotor activity and A1 adenosine receptor binding, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 1993, pp. 1563-1572.

Karacan I., Thornby J. I., Anch M., Booth G. H., Williams R. L. and Salis P. J., Dose-related sleep disturbances induced by coffee and caffeine, *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1976, pp. 682-689.

Kauffmann G. W., Moser E. and Sauer R., *Physikalische Grundlagen der Radiologie*, München: Elsevier Urban & Fischer, 2006.

Kaufman E. F., Rosenquist A. C. and Raczkowski D., The projections of single thalamic neurons onto multiple visual cortical areas in the cat, *Brain research*, 1984, pp. 171-174.

Kolb B. and Whishaw I. Q., *Neuropsychologie*: Spektrum Akademischer Verlag, 1996.

Krebs C., Weinberg J. and E. A., *Neuroscience (Lippincott Illustrated Reviews Series): LWW; North American Edition*, 2011.

Kroll T., Elmenhorst D., Weisshaupt A., Beer S. and Bauer A., Reproducibility of non-invasive a1 adenosine receptor quantification in the rat brain using [(18)F]CPFPX and positron emission tomography, *Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging*, 2014, pp. 699-709.

Krueger J. M., Rector D. M., Roy S., Van Dongen H. P., Belenky G. and Panksepp J., Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies, *Nature reviews. Neuroscience*, 2008, pp. 910-919.

Krueger J. M., Taishi P., De A., Davis C. J., Winters B. D., Clinton J., Szentirmai E. and Zielinski M. R., ATP and the purine type 2 X7 receptor affect sleep, *Journal of applied physiology*, 2010, pp. 1318-1327.

Lachance M. P., Marlowe C. and Waddell W. J., Autoradiographic disposition of [1-methyl-¹⁴C]- and [2-¹⁴C]caffeine in mice, *Toxicology and applied pharmacology*, 1983, pp. 237-241.

Lammertsma A. A. and Hume S. P., Simplified reference tissue model for PET receptor studies, *NeuroImage*, 1996, pp. 153-158.

Landolt H. P., Werth E., Borbely A. A. and Dijk D. J., Caffeine intake (200 mg) in the morning affects human sleep and EEG power spectra at night, *Brain research*, 1995, pp. 67-74.

Lappas C. M., Sullivan G. W. and Linden J., Adenosine A2A agonists in development for the treatment of inflammation, *Expert opinion on investigational drugs*, 2005, pp. 797-806.

Latini R., Bonati M., Marzi E., Tacconi M. T., Sadurska B. and Bizzi A., Caffeine disposition and effects in young and one-year old rats, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 1980, pp. 596-599.

Latini S., Bordoni F., Pedata F. and Corradetti R., Extracellular adenosine concentrations during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices, *British journal of pharmacology*, 1999, pp. 729-739.

Latini S. and Pedata F., Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations, *Journal of neurochemistry*, 2001, pp. 463-484.

Laurent C., Eddarkaoui S., Derisbourg M., Leboucher A., Demeyer D., Carrier S., Schneider M., Hamdane M., Muller C. E., Buee L. and Blum D., Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology, *Neurobiology of aging*, 2014, pp. 2079-2090.

Laurin D., Masaki K. H., Foley D. J., White L. R. and Launer L. J., Midlife dietary intake of antioxidants and risk of late-life incident dementia: the Honolulu-Asia Aging Study, *Am J Epidemiol*, 2004, pp. 959-967.

Ledderose C., Schematischer Überblick über die Kopplung der vier Adenosinrezeptorsubtypen an heterotrimere Gi- bzw. Gs-Proteine, 2007.

Liu X., Smith B. J., Chen C., Callegari E., Becker S. L., Chen X., Cianfrogna J., Doran A. C., Doran S. D., Gibbs J. P., Hosea N., Liu J., Nelson F. R., Szewc M. A. and Van Deusen J., Use of a physiologically based pharmacokinetic model to study the time to reach

brain equilibrium: an experimental analysis of the role of blood-brain barrier permeability, plasma protein binding, and brain tissue binding, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 2005, pp. 1254-1262.

Liu X., Smith B. J., Chen C., Callegari E., Becker S. L., Chen X., Cianfrogna J., Doran A. C., Doran S. D., Gibbs J. P., Hosea N., Liu J., Nelson F. R., Szewc M. A. and Van Deusen J., Evaluation of cerebrospinal fluid concentration and plasma free concentration as a surrogate measurement for brain free concentration, *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 2006, pp. 1443-1447.

Llinas R. R. and Steriade M., Bursting of thalamic neurons and states of vigilance, *Journal of neurophysiology*, 2006, pp. 3297-3308.

Lohse M. J., Lenschow V. and Schwabe U., Two affinity states of R_1 adenosine receptors in brain membranes. Analysis of guanine nucleotide and temperature effects on radioligand binding, *Molecular pharmacology*, 1984, pp. 1-9.

Lüllmann H., Mohr K. and Hein L., *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2010.

Mally J. and Stone T. W., The effect of theophylline on parkinsonian symptoms, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 1994, pp. 515-517.

Maquet P., Understanding non rapid eye movement sleep through neuroimaging, *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 2010, pp. 9-15.

Marangos P. J., Boulenger J. P. and Patel J., Effects of chronic caffeine on brain adenosine receptors: regional and ontogenetic studies, *Life sciences*, 1984, pp. 899-907.

Marpegan L., Swannstrom A. E., Chung K., Simon T., Haydon P. G., Khan S. K., Liu A. C., Herzog E. D. and Beaulieu C., Circadian regulation of ATP release in astrocytes, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2011, pp. 8342-8350.

Mathot R. A., Van der Wenden E. M., Soudijn W., AP I. J. and Danhof M., Deoxyribose analogues of N⁶-cyclopentyladenosine (CPA): partial agonists at the adenosine A₁ receptor in vivo, *British journal of pharmacology*, 1995, pp. 1957-1964.

Matusch A., Meyer P. T., Bier D., Holschbach M. H., Voitalla D., Elmenhorst D., Winz O. H., Zilles K. and Bauer A., Metabolism of the A₁ adenosine receptor PET ligand [¹⁸F]CPFPX by CYP1A2: implications for bolus/infusion PET studies, *Nuclear medicine and biology*, 2006, pp. 891-898.

McCall A. L., Millington W. R. and Wurtman R. J., Blood-brain barrier transport of caffeine: dose-related restriction of adenine transport, *Life sciences*, 1982, pp. 2709-2715.

McCarley R. W. and Hobson J. A., Neuronal excitability modulation over the sleep cycle: a structural and mathematical model, *Science*, 1975, pp. 58-60.

McCormick D. A. and Bal T., Sleep and Arousal: Thalamocortical Mechanism, *Annual review of neuroscience*, 1997, pp. 185-215.

Meerlo P., Roman V., Farkas E., Keijser J. N., Nyakas C. and Luiten P. G., Ageing-related decline in adenosine A1 receptor binding in the rat brain: an autoradiographic study, *Journal of neuroscience research*, 2004, pp. 742-748.

Mesas A. E., Leon-Munoz L. M., Rodriguez-Artalejo F. and Lopez-Garcia E., The effect of coffee on blood pressure and cardiovascular disease in hypertensive individuals: a systematic review and meta-analysis, *The American journal of clinical nutrition*, 2011, pp. 1113-1126.

Methippara M. M., Kumar S., Alam M. N., Szymusiak R. and McGinty D., Effects on sleep of microdialysis of adenosine A1 and A2a receptor analogs into the lateral preoptic area of rats, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2005, pp. R1715-1723.

Meyer P. T., Bier D., Holschbach M. H., Cremer M., Tellmann L. and Bauer A., In vivo imaging of rat brain A1 adenosine receptor occupancy by caffeine, *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 2003, p. 1440.

Meyer P. T., Elmenhorst D., Matusch A., Winz O., Zilles K. and Bauer A., A1 adenosine receptor PET using [18F]CPFPX: displacement studies in humans, *NeuroImage*, 2006, pp. 1100-1105.

Meyer P. T., Elmenhorst D., Boy C., Winz O., Matusch A., Zilles K. and Bauer A., Effect of aging on cerebral A1 adenosine receptors: A [18F]CPFPX PET study in humans, *Neurobiology of aging*, 2007, pp. 1914-1924.

Miyazaki M., Kayama Y., Kihara T., Kawasaki K., Yamaguchi E., Wada Y. and Ikeda M., Possible release of nitric oxide from cholinergic axons in the thalamus by stimulation of the rat laterodorsal tegmental nucleus as measured with voltammetry, *Journal of chemical neuroanatomy*, 1996, pp. 203-207.

Mohnike W. and Hör G., PET/CT-Atlas: Ein interdisziplinärer Leitfaden der onkologischen PET/CT-Diagnostik: Springer Berlin Heidelberg, 2007, p. 516.

Morgan K. J., Stults V. J. and Zabik M. E., Amount and dietary sources of caffeine and saccharin intake by individuals ages 5 to 18 years, *Regulatory toxicology and pharmacology* : RTP, 1982, pp. 296-307.

Mulisch M. and Welsch U., *Romeis - Mikroskopische Technik*: Springer Verlag, 2010.

Muller-Limmroth W., [Effect of caffeine containing and caffeine free coffee on human sleep], *Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft. Journal of nutritional sciences. Supplementa*, 1972, pp. Suppl 14:46-53.

Muller M., Science, medicine, and the future: Microdialysis, *Bmj*, 2002, pp. 588-591.

Murillo-Rodriguez E., Blanco-Centurion C., Gerashchenko D., Salin-Pascual R. J. and Shiromani P. J., The diurnal rhythm of adenosine levels in the basal forebrain of young and old rats, *Neuroscience*, 2004, pp. 361-370.

Nehlig A., Daval J. L. and Debry G., Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects, *Brain research. Brain research reviews*, 1992, pp. 139-170.

Noh K., Nepal M. R., Jeong K. S., Kim S. A., Um Y. J., Seo C. S., Kang M. J., Park P. H., Kang W., Jeong H. G. and Jeong T. C., Effects of baicalin on oral pharmacokinetics of caffeine in rats, *Biomolecules & therapeutics*, 2015, pp. 201-206.

Nordstokke D. W. and Zumbo B. D., A new nonparametric Levene Test for Equal Variances, *Psicologica*, 2010, pp. 401-430.

Osborn G. K., Jones D. C. and Kimeldorf D. J., Water consumption of the ageing Sprague-Dawley male rat, *Gerontologia*, 1962, pp. 65-71.

Paris D., Quadros A., Humphrey J., Patel N., Crescentini R., Crawford F. and Mullan M., Nilvadipine antagonizes both Abeta vasoactivity in isolated arteries, and the reduced cerebral blood flow in APPsw transgenic mice, *Brain research*, 2004, pp. 53-61.

Paxinos G. and Watson C., *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*: Academic Press, 1998.

Peter H., Penzel T. and Peter H. H., *Enzyklopädie der Schlafmedizin*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007.

Pettenuzzo L. F., Noschang C., von Pozzer Toigo E., Fachin A., Vendite D. and Dalmaz C., Effects of chronic administration of caffeine and stress on feeding behavior of rats, *Physiology & behavior*, 2008, pp. 295-301.

Phillis J. W. and Wu P. H., The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission, *Progress in neurobiology*, 1981, pp. 187-239.

Porkka-Heiskanen T., Strecker R. E., Thakkar M., Bjorkum A. A., Greene R. W. and McCarley R. W., Adenosine: a mediator of the sleep-inducing effects of prolonged wakefulness, *Science*, 1997, pp. 1265-1268.

Porkka-Heiskanen T., Strecker R. E. and McCarley R. W., Brain site-specificity of extracellular adenosine concentration changes during sleep deprivation and spontaneous sleep: an in vivo microdialysis study, *Neuroscience*, 2000, pp. 507-517.

Portas C. M., Thakkar M., Rainnie D. G., Greene R. W. and McCarley R. W., Role of adenosine in behavioral state modulation: a microdialysis study in the freely moving cat, *Neuroscience*, 1997, pp. 225-235.

Postuma R. B., Lang A. E., Munhoz R. P., Charland K., Pelletier A., Moscovich M., Filla L., Zanatta D., Rios Romenets S., Altman R., Chuang R. and Shah B., Caffeine for treatment of Parkinson disease: a randomized controlled trial, *Neurology*, 2012, pp. 651-658.

Qi H. and Li S., Dose-response meta-analysis on coffee, tea and caffeine consumption with risk of Parkinson's disease, *Geriatrics & gerontology international*, 2014, pp. 430-439.

Radek R. J., Decker M. W. and Jarvis M. F., The adenosine kinase inhibitor ABT-702 augments EEG slow waves in rats, *Brain research*, 2004, pp. 74-83.

Ramkumar V., Bumgarner J. R., Jacobson K. A. and Stiles G. L., Multiple components of the A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system are regulated in rat cerebral cortex by chronic caffeine ingestion, *The Journal of clinical investigation*, 1988, pp. 242-247.

Rhoads D. E., Huggler A. L. and Rhoads L. J., Acute and adaptive motor responses to caffeine in adolescent and adult rats, *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 2011, pp. 81-86.

Rivera-Oliver M. and Diaz-Rios M., Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: a review, *Life sciences*, 2014, pp. 1-9.

Rosati A. M., Traversa U., Florio C. and Vertua R., Circadian rhythm of cortical and striatal adenosine receptors, *Life sciences*, 1993, pp. 1677-1684.

Rosso A., Mossey J. and Lippa C. F., Caffeine: neuroprotective functions in cognition and Alzheimer's disease, *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*, 2008, pp. 417-422.

Rudolphi K. A., Keil M., Fastbom J. and Fredholm B. B., Ischaemic damage in gerbil hippocampus is reduced following upregulation of adenosine (A1) receptors by caffeine treatment, *Neuroscience letters*, 1989, pp. 275-280.

Rudolphi K. A., Schubert P., Parkinson F. E. and Fredholm B. B., Adenosine and brain ischemia, *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*, 1992a, pp. 346-369.

Rudolphi K. A., Schubert P., Parkinson F. E. and Fredholm B. B., Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia, *Trends in pharmacological sciences*, 1992b, pp. 439-445.

Rudolphi K. A. and Schubert P., Modulation of neuronal and glial cell function by adenosine and neuroprotection in vascular dementia, *Behavioural brain research*, 1997, pp. 123-128.

Salvemini D., Kim S. F. and Mollace V., Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 2013, pp. R473-487.

Schiffer W. K., Mirrione M. M., Biegon A., Alexoff D. L., Patel V. and Dewey S. L., Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant, *Journal of neuroscience methods*, 2006, pp. 272-284.

Schwierin B., Borbely A. A. and Tobler I., Effects of N6-cyclopentyladenosine and caffeine on sleep regulation in the rat, *European journal of pharmacology*, 1996, pp. 163-171.

Sengupta P., The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's, *International journal of preventive medicine*, 2013, pp. 624-630.

Shukitt-Hale B., Miller M. G., Chu Y. F., Lyle B. J. and Joseph J. A., Coffee, but not caffeine, has positive effects on cognition and psychomotor behavior in aging, *Age*, 2013, pp. 2183-2192.

Song M., Wang T., Li Q., Zhao L., Fang H., Li D. and Bi K., Identification and dynamic analysis of the purine alkaloids in rat plasma after oral administration of green tea by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry, *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2012, pp. 23-29.

Steriade M., Pare D., Parent A. and Smith Y., Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey, *Neuroscience*, 1988, pp. 47-67.

Steriade M., Brain activation, then (1949) and now: coherent fast rhythms in corticothalamic networks, *Archives italiennes de biologie*, 1995, pp. 5-20.

Steriade M., Brainstem activation of thalamocortical systems, *Brain research bulletin*, 1999, pp. 391-392.

Stone T. W., Receptors for adenosine and adenine nucleotides, *General pharmacology*, 1991, pp. 25-31.

Sutherland G. R., Peeling J., Lesiuk H. J., Brownstone R. M., Rydzy M., Saunders J. K. and Geiger J. D., The effects of caffeine on ischemic neuronal injury as determined by magnetic resonance imaging and histopathology, *Neuroscience*, 1991, pp. 171-182.

Tang-Liu D. D. and Riegelman S., Metabolism of theophylline to caffeine in adults, *Research communications in chemical pathology and pharmacology*, 1981, pp. 371-380.

Thakkar M. M., Delgiacco R. A., Strecker R. E. and McCarley R. W., Adenosinergic inhibition of basal forebrain wakefulness-active neurons: a simultaneous unit recording and microdialysis study in freely behaving cats, *Neuroscience*, 2003, pp. 1107-1113.

Tobler I., Napping and polyphasic sleep in mammals, Dinges, D.F., Broughton, R.J.: *Chronobiological, Behavioral and Medical Aspects of Napping*. Raven Press, New York, 1989, pp. 9-30.

Traversa U., Rosati A. M., Florio C. and Vertua R., Effects of chronic administration of adenosine antagonists on adenosine A1 and A2a receptors in mouse brain, *In vivo*, 1994, pp. 1073-1078.

Tsutsui S., Schnermann J., Noorbakhsh F., Henry S., Yong V. W., Winston B. W., Warren K. and Power C., A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2004, pp. 1521-1529.

Tyralla E. E. and Dodson W. E., Caffeine secretion into breast milk, *Archives of disease in childhood*, 1979, pp. 787-789.

Ulas J., Brunner L. C., Nguyen L. and Cotman C. W., Reduced density of adenosine A1 receptors and preserved coupling of adenosine A1 receptors to G proteins in

Alzheimer hippocampus: a quantitative autoradiographic study, *Neuroscience*, 1993, pp. 843-854.

Ungerstedt U., Microdialysis - a new bioanalytical sampling technique, *Curr. Separations*, 1986, pp. 43-46.

van der Veldt A. A., Smit E. F. and Lammertsma A. A., Positron Emission Tomography as a Method for Measuring Drug Delivery to Tumors in vivo: The Example of [(11)C]docetaxel, *Frontiers in oncology*, 2013, p. 208.

van Gelder B. M., Buijsse B., Tijhuis M., Kalmijn S., Giampaoli S., Nissinen A. and Kromhout D., Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study, *European journal of clinical nutrition*, 2007, pp. 226-232.

Vazquez J., Lydic R. and Baghdoyan H. A., The nitric oxide synthase inhibitor NG-Nitro-L-arginine increases basal forebrain acetylcholine release during sleep and wakefulness, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2002, pp. 5597-5605.

Vincent S. R. and Kimura H., Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain, *Neuroscience*, 1992, pp. 755-784.

Vincent S. R., Williams J. A., Reiner P. B. and el-Husseini A. e.-D., Monitoring neuronal NO release in vivo in cerebellum, thalamus and hippocampus, *Progress in brain research*, 1998, pp. 27-35.

Virus R. M., Baglajewski T. and Radulovacki M., Circadian variation of [3H]N6-(L-phenylisopropyl)adenosine binding in rat brain, *Neurosci Lett*, 1984, pp. 219-222.

Wang Y. and Lau C. E., Caffeine has similar pharmacokinetics and behavioral effects via the i.p. and p.o. routes of administration, *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 1998, pp. 271-278.

Wardas J., Neuroprotective role of adenosine in the CNS, *Polish journal of pharmacology*, 2002, pp. 313-326.

Weiss J., Becker K., Bernsmann E., Chourbaji S. and Dietrich H., Versuchstierkunde: Tierpflege in Forschung und Klinik: Enke, 2014.

Westerink B. H., Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour, *Behavioural brain research*, 1995, pp. 103-124.

Wigren H. K., Schepens M., Matto V., Stenberg D. and Porkka-Heiskanen T., Glutamatergic stimulation of the basal forebrain elevates extracellular adenosine and increases the subsequent sleep, *Neuroscience*, 2007, pp. 811-823.

Williams J. A., Vincent S. R. and Reiner P. B., Nitric oxide production in rat thalamus changes with behavioral state, local depolarization, and brainstem stimulation, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 1997, pp. 420-427.

Womac A. D., Burkeen J. F., Neuendorff N., Earnest D. J. and Zoran M. J., Circadian rhythms of extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus cells and cultured astrocytes, *The European journal of neuroscience*, 2009, pp. 869-876.

Wu P. H. and Coffin V. L., Up-regulation of brain [3H]diazepam binding sites in chronic caffeine-treated rats, *Brain research*, 1984, pp. 186-189.

Xu K., Xu Y. H., Chen J. F. and Schwarzschild M. A., Neuroprotection by caffeine: time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease, *Neuroscience*, 2010, pp. 475-481.

Yadav S., Gupta S. P., Srivastava G., Srivastava P. K. and Singh M. P., Role of secondary mediators in caffeine-mediated neuroprotection in maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse, *Neurochemical research*, 2012, pp. 875-884.

Yanik G. and Radulovacki M., REM sleep deprivation up-regulates adenosine A1 receptors, *Brain research*, 1987, pp. 362-364.

Zaborszky L., Pang K., Somogyi J., Nadasdy Z. and Kallo I., The basal forebrain corticopetal system revisited, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999, pp. 339-367.

Zeitzer J. M., Morales-Villagran A., Maidment N. T., Behnke E. J., Ackerson L. C., Lopez-Rodriguez F., Fried I., Engel J., Jr. and Wilson C. L., Extracellular adenosine in the human brain during sleep and sleep deprivation: an in vivo microdialysis study, *Sleep*, 2006, pp. 455-461.

Zielke C. L. and Zielke H. R., Chronic exposure to subcutaneously implanted methylxanthines. Differential elevation of A1-adenosine receptors in mouse cerebellar and cerebral cortical membranes, *Biochemical pharmacology*, 1987, pp. 2533-2538.

Danksagung

Meine Promotionsarbeit habe ich von September 2012 bis Dezember 2015 am Institut für Neurowissenschaften und Medizin des Forschungszentrums Jülich unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Bauer durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt daher in erster Linie **Prof. Dr. Andreas Bauer** für die Überlassung des interessanten und anspruchsvollen Promotionsthemas sowie für die stetige Zuversicht und Unterstützung, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei **Prof. Dr. Klaus Mohr** möchte ich mich für die Betreuung von Seiten der Universität Bonn, für sein Interesse an meiner Arbeit und die Begutachtung meiner Dissertationsschrift bedanken.

Bei **Prof. Dr. Evi Kostenis** und **Priv.-Doz. Dr. Maria Angelica de Souza Silva** möchte ich mich bedanken, dass Sie die Dritt- bzw. Viertprüferposition am Tag meiner mündlichen Prüfung übernommen haben.

Dr. Tina Kroll danke ich vor allem für die immer vorhandene Ansprechbarkeit, die Unterstützung im tierexperimentellen Bereich und die vielen Ratschläge. Bei Ihr, Dr. David Elmenhorst und Dr. Andreas Matusch möchte ich mich für die Unterstützung bei der Studienorganisation bedanken.

Für die technische Unterstützung möchte ich mich bei Angelika Börner, Stephanie Krause, Angela Oskamp, Andrea Radermacher, Daniela Schneider, Tim Urbansky und Magdalene Vögeling bedanken. Ein herzliches Dankeschön gilt aber auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, dem ZEA-3 sowie den Tierhausmädels und -jungs.

Franziska Wedekind danke ich herzlich für die menschliche und wissenschaftliche Anteilnahme. Bei Ihr und meinen wunderbaren

Bürokolleginnen möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonderer Dank gilt aber vor allem Stefanie Laskowski. Ich bin unendlich dankbar dafür, dass ich dich in dieser Zeit an meiner Seite hatte und werde oft an die, den Umständen entsprechend, *schöne* Zeit der Nachtschichten zurückdenken. Mit deinem Rückhalt und deiner anhaltenden Unterstützung warst du die beste Kollegin, die man sich vorstellen kann. Danke Franzi, Steffi und Daniela für die letzten 3 Jahre, ich weiß nicht, was ich ohne Euch gemacht hätte.

Weiterhin möchte ich mich für viel Kuchen/Schoki, Kaffee und den witzigen Arbeitsalltag bei meinen Institutskollegen Kim Schaffrath, Jawad Jawadi, Manni Marx, Steffi Geisler und Werner Hucko bedanken.

Ein ganz besonderer und großer Dank geht auch an meine Familie und Freunde:

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Schwager danke ich für die Liebe, die stetige Unterstützung und das unerschütterliche Vertrauen in mich, besonders dann, als ich keins mehr hatte.

Meinen Mädels will ich danken, dass ihr immer für mich da seid, in jeder Lebenslage die richtigen Worte findet und dass Ihr das ein oder andere Korrekturlesen über euch ergehen lassen musstet.

Last, but not least will ich mich bei meinem besten Freund und Lebenspartner bedanken. Für das, was ich für dich empfinde und wie dankbar ich dir bin, schon alleine, dass du in meinem Leben bist, erscheinen keinerlei Worte gut genug. Ich kann nur hoffen, dass ich dir halbwegs so viel gebe wie du mir...